



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Tecnologia

Carina Cristina de Jesus Azevedo

**“Auramina: Ecotoxicidade e desenvolvimento de método para sua
detecção em águas”**

Limeira

2016

Carina Cristina de Jesus Azevedo

**“Auramina: Ecotoxicidade e desenvolvimento de método para sua
detecção em águas”**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Tecnologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Mestre em
Tecnologia, na área de Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro

Co-orientadora: Cassiana Carolina Montagner Raimundo

Este exemplar corresponde à versão
final da tese defendida pela aluna
Carina Cristina de Jesus Azevedo, e
orientada pela Profa. Dra. Gisela de
Aragão Umbuzeiro.

Limeira

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Tecnologia
Silvana Moreira da Silva Soares - CRB 8/3965

Azevedo, Carina Cristina de Jesus, 1988-
Az25 Auramina : ecotoxicidade e desenvolvimento de método para sua detecção em águas / Carina Cristina de Jesus Azevedo. – Limeira, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Gisela de Aragão Umbuzeiro.
Coorientador: Cassiana Carolina Montagner Raimundo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Tecnologia.

1. Corantes. 2. Toxicidade. 3. Cromatografia. I. Umbuzeiro, Gisela de Aragão, 1957-. II. Raimundo, Cassiana Carolina Montagner, 1981-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Tecnologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Auramine : ecotoxicity and method development for detection in water

Palavras-chave em inglês:

Dyes

Toxicity

Chromatography

Área de concentração: Ambiente

Titulação: Mestra em Tecnologia

Banca examinadora:

Gisela de Aragão Umbuzeiro

Marta Siviero Guilherme Pires

Fábio Kummrow

Data de defesa: 29-02-2016

Programa de Pós-Graduação: Tecnologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: AMBIENTE

Auramina: Ecotoxicidade e desenvolvimento de método para sua detecção em águas

Autora: Carina Cristina de Jesus Azevedo

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:

Profª Dra Gisela de Aragão Umbuzeiro
FT/UNICAMP

Profª Dra Marta Siviero Guilherme Pires
FT/UNICAMP

Prof. Dr. Fábio Kummrow
UNIFESP

A Ata da Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedico este trabalho aos meus pais, Geraldo e Maria por todo apoio, amor e carinho que sempre me deram.

“O senhor é a minha força e meu escudo; nele confiei meu coração e fui socorrido; o meu coração salta de prazer, e com meu canto o louvarei.” (Salmos, 28:7)

Agradecimentos

Antes de tudo, agradeço a Deus, pois eu não seria nada sem a fé que eu tenho nele.

Agradeço meus pais, Geraldo e Maria e meus irmão, Carlos e Rogério, pois nada teria conquistado sem o amor da minha família.

Agradeço ao meu namorado Renan, pelo amor, carinho, paciência, ajuda e incentivo que sempre me deu. Com certeza, você foi a pessoa que mais me socorreu nos meus momentos de angústia e aflição.

À Prof^a Dr^a Gisela de Aragão Umbuzeiro, pelos valiosos ensinamentos, orientação, confiança e oportunidades oferecidas.

À Prof^a Dr^a Cassiana Carolina Montagner Raimundo, pela co-orientação, paciência e todos os ensinamentos.

À Cristiane pela ajuda nas análises cromatográficas, mas acima de tudo pela amizade.

Aos professores Dr. César Grisólia e o Dr. Rhaul de Oliveira e ao mestrando Diego Moura pelos ensinamentos e ajuda nos testes com embriões de *Danio rerio*.

Aos colegas do LEAL, Adria, Josiane, Mariana, Monizze, Daniel e Vitória, pela amizade e pelos momentos de descontração. Em especial, a Anjaina e Francine por toda ajuda e paciência que tiveram na correção da minha dissertação, muito obrigada, de coração.

À minha amiga de todas as horas Amanda, pela amizade, carinho, e principalmente pela força que sempre me deu para que eu chegasse até o fim, com certeza teria sido tudo mais difícil sem a sua companhia.

As minhas amigas irmãs que a vinda pra Limeira me proporcionou, Bruna, Bruninha, Deiseane, Renata, Patrícia e Maíne. Vocês morarão para sempre no meu coração.

À Unicamp, pela oportunidade e pelo ensino gratuito de qualidade.

À Capes pela bolsa concedida.

À FAPESP - Projeto Temático 2008/10449-7 pelo financiamento desta pesquisa.

RESUMO

Auramina é um corante do grupo químico difenilmetano, e, dentre suas diversas aplicações, estão incluídas o tingimento de tecido e de papel. O mesmo pode contaminar o ambiente aquático através do despejo de efluentes. Embora, a sua produção tenha sido proibida em alguns países por sua reconhecida carcinogenicidade, existem evidências que o corante auramina ainda está em uso no mundo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda e crônica do corante auramina utilizando organismos aquáticos representativos de três níveis tróficos, e a partir dos mesmos derivar um critério para proteção da vida aquática, além de desenvolver um método analítico para determinação deste corante em águas, proporcionando subsídios para uma avaliação de risco. Após a realização dos testes o seguinte ranking de toxicidade do corante auramina para organismos aquáticos pode ser estabelecido: *R. subcapitata* > *D. similis* > *D. rerio* > *H. attenuata*. Um critério de 1,2 µg L⁻¹ foi derivado para o corante auramina, baseado no menor CENO obtido (*R. subcapitata* - 60 µg L⁻¹) e dividido por um fator de avaliação de 50. O método analítico desenvolvido empregou extração líquido-líquido e HPLC-DAD, no qual foi obtido um limite de quantificação aproximadamente 10 vezes menor que o critério derivado. O critério derivado e o método desenvolvido poderão auxiliar outros grupos de trabalho ou até mesmo agências governamentais em uma futura avaliação de risco do corante auramina para proteção da vida aquática.

Palavras chaves: Corantes, Toxicidade, Cromatografia.

ABSTRACT

Auramine is a diphenylmethane dye, and among its applications are included dyeing textile and paper. Dyes can contaminate the aquatic environment through industrial wastewater discharge. Although, auramine production has been prohibited in some countries for its carcinogenicity, there is evidence that it is still in use worldwide. The objective of this study was to evaluate the acute and chronic toxicity of auramine dye using aquatic organisms of three trophic levels, and to develop an analytical method for the determination of this dye in water, providing subsidies to a risk assessment. The following ranking of the auramine dye toxicity was established: *R. subcapitata* > *D. similis* > *D. rerio* > *H. attenuate*. A criterion of environmental protection of $1,2 \mu\text{g L}^{-1}$ was derived to auramine dye, based on the lowest NOEC obtained (*R. subcapitata* - $60 \mu\text{g L}^{-1}$) and divided by an assessment factor of 50. The analytical method developed employed liquid-liquid extraction and HPLC-DAD, with a quantification limit of 10 times smaller than the criterion derivative was obtained. The data obtained in this study will support future risk assessment of auramine dye to the protection of aquatic life.

Key-words: Dyes, Toxicity, Chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas dos corantes: auramina e hidrocloreto de auramina.	16
Figura 2. Organismos utilizados nos testes ecotoxicológicos	27
Figura 3. Desenvolvimento do peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>)..	30
Figura 4. Esquema do procedimento adotado no teste com embrião de <i>Danio rerio</i>	31
Figura 5. Mudanças morfológicas em <i>Hydra attenuata</i>	32
Figura 6. Resultados do teste de toxicidade do corante auramina para <i>R. Subcapitata</i>	41
Figura 7. Resultados dos testes de toxicidade do corante auramina para <i>D. similis</i>	41
Figura 8. Toxicidade do corante auramina para <i>Hydra attenuata</i>	42
Figura 9. Efeitos do corante auramina observados na morfologia dos tentáculos das <i>hydras</i> pós 96 horas de exposição.	42
Figura 10. Curva dose resposta dos testes agrupados para determinação da concentração letal a 50% dos embriões de <i>D. rerio</i>	43
Figura 11. Anormalidades observadas nos embriões de <i>D. rerio</i>	45
Figura 12. Fotos da anormalidades nos embriões de <i>D. rerio</i>	46
Figura 13. . Cromatograma e espectro de absorção do corante auramina obtidos por HPLC-DAD para um padrão de 1,0 mg.L ⁻¹	49
Figura 14. Curva analítica empregando padrões externos em HPLC-DAD construída para o corante auramina.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclatura e propriedades físico-químicas do corante auramina.....	26
Tabela 2. Conjunto de dados necessários e seus respectivos fatores de avaliação utilizados para derivar critérios de qualidade para água doce.....	34
Tabela 3. Resultados dos testes ecotoxicológicos com o corante auramina.....	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CAS: *Chemical Abstracts Service Number*

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CENO: Concentração de Efeito Não Observado

CG: Cromatografia Gasosa

CI: *Color Index*

CI50: Concentração que inibição para 50% dos organismos

CE50: Concentração de efeito em 50% dos organismos

CL50: Concentração letal em 50% dos organismos

CV: Coeficiente de Variação

DAD: Detector de Arranjo de Diodos

DL50: Dose Letal para 50% dos organismos

DP: Desvio padrão

DMSO: Dimetilsulfóxido

EPA: *Environmental Protection Agency*

FLO: Detector de ionização de chama

FM: Fase móvel

FT: Faculdade de Tecnologia

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPCL-DAD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detectores de Arranjo de Diodos

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

IC: Intervalo de Confiança

k': Fator de retenção

Kow: Coeficiente de partição octanol/água

LC/MS: Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas

LC-ESI-MS/MS: Cromatografia Líquida acoplada á Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray

LD: Limite de detecção

LLE: Extração Líquido-Líquido

LQ: Limite de quantificação

LEAL: Laboratório de Ecotoxicologia Aquática e Microbiologia Ambiental Prof.

Abílio Lopes

MEC: *Measured Environmental Concentration*

MS: Espectrometria de Massas

OECD: *Organization for Economic Co-operation and Development*

PNEC: *Predicted No Effect Concentration*

pka: Constante de dissociação ácida

RQ: *Risk Quotient*

tR: tempo de retenção

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 AURAMINA	16
2.2 CORANTES: Como chegam ao ambiente e toxicidade para organismos aquáticos .	18
2.3 OCORRÊNCIA DE CORANTES EM ÁGUAS	20
2.4 DERIVAÇÃO DE CRITÉRIO PARA PROTEÇÃO DA VIDA AQUÁTICA	23
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 AMOSTRA.....	26
4.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	27
4.2.1 Teste de toxicidade crônica com alga <i>R. subcapitata</i>	28
4.2.2 Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i>	28
4.2.3 Teste de toxicidade crônica com <i>Daphnia similis</i>	29
4.2.4 Teste de toxicidade aguda com embriões de <i>Danio rerio</i>	30
4.2.5 Teste de toxicidade aguda com <i>Hydra attenuata</i>	32
4.2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICA.....	33
4.3 DERIVAÇÃO DE CRITÉRIO PARA PROTEÇÃO DA VIDA AQUÁTICA	34
4.4 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE AURAMINA EM ÁGUAS	35
4.4.1 Análise Cromatográfica.....	35
4.4.2 Extração líquido-líquido.....	36
4.4.3 Parâmetros verificados	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO CORANTE AURAMINA	40
5.2 DERIVAÇÃO DO CRITÉRIO PARA PROTEÇÃO DA VIDA AQUÁTICA	48
5.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO CORANTE AURAMINA EM ÁGUAS.....	49
5.3.1 Análise Cromatográfica.....	49
5.3.2 Parâmetros verificados	50
6. CONCLUSÃO.....	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO 1 - CARTAS CONTROLE DOS ORGANISMOS TESTES	63

1. INTRODUÇÃO

Corantes são considerados contaminantes emergentes e trabalhos na literatura relatam a sua ocorrência em corpos d'água (Maguire e Tracz, 1991; Rajaguru *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2010; Zocolo *et al.*, 2015). A presença de corantes em águas superficiais ocorre principalmente devido ao seu grande uso industrial e a baixa eficiência de remoção desses compostos pelas tecnologias de tratamentos de efluentes convencionais (USEPA, 1989; Guaratini e Zanoni, 2000; Oliveira *et al.*, 2007).

Auramina é um corante do grupo químico difenilmetano utilizada em diversas aplicações, destacando-se o tingimento de tecidos e papéis. Embora a sua produção tenha sido proibida em alguns países por sua reconhecida carcinogenicidade, existem evidências que o corante auramina ainda está em uso no mundo (IARC, 2010; Tripathi *et al.*, 2007; Lin, 2007; Li *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014). No entanto, não há um método analítico disponível na literatura para determinação do corante auramina em águas, dificultando a verificação da ocorrência deste composto em amostras ambientais; além disso, é escasso na literatura estudos sobre sua toxicidade para organismos aquáticos.

Tendo em vista que esse corante é comercializado e sabendo da ineficiência das tecnologias de tratamentos de efluentes convencionais, não podemos descartar a possibilidade de este composto estar presente nas águas superficiais onde a preservação da vida aquática e, até mesmo, o uso para consumo humano são priorizados. O desenvolvimento de um método analítico que pudesse ser aplicado na determinação do corante auramina em amostras de águas seria de grande importância. Porém, somente conhecer as concentrações de corantes que estão presentes nas águas superficiais não é suficiente quando necessita verificar se as mesmas são protetivas

para a vida aquática em recursos hídricos classificados para esse fim. É necessário comparar esses valores com um critério, que é uma concentração segura e que não apresenta efeitos adversos aos organismos aquáticos (EUROPEAN COMMISSION, 2011; Lepper, 2005; SBMCTA, 2011). Para obtenção desse critério é necessário uma avaliação da toxicidade do composto que deve ser realizada contemplando preferencialmente diferentes níveis tróficos: produtores, consumidores primários e consumidores secundários, sempre que possível (Azevedo e Chasin, 2004). A partir dos ensaios ecotoxicológicos realizados para uma determinada substância é possível derivar um critério para proteção da vida aquática, conhecido internacionalmente como PNEC (*Predicted No Effect Concentration*) (EUROPEAN COMMISSION, 2011; Lepper, 2005; SBMCTA, 2011).

Uma primeira abordagem da avaliação do risco de compostos químicos para o ambiente aquático pode ser obtida comparando a concentração ambiental, conhecida como MEC (*Measured Environmental Concentration*) com o PNEC, obtendo-se o coeficiente de risco conhecido internacionalmente como RQ (*Risk Quotient*). Em geral, valores de RQ menores que 1 indicam que o composto não impõe risco ambiental (Godoy et al., 2015).

Os dados obtidos neste trabalho permitirão subsidiar uma futura avaliação do risco relacionado à presença de auramina em corpos d'água objetivando a proteção da vida aquática. Isso tem grande relevância ambiental, uma vez que, o mesmo ainda é comercializado e pode estar presentes nos corpos d'água.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AURAMINA

O corante auramina e seu sal, hidrocloreto de auramina (Figura 1), pertencem à classe dos difenilmetanos, caracterizados pela presença de dois grupos arilo terminais. Esses corantes possuem estruturas muito semelhantes, diferenciadas apenas por uma ser ionizada e a outra neutra; sendo que a ionização da molécula do hidrocloreto de auramina aumenta a sua polaridade, facilitando a sua aplicabilidade no tingimento. Esses corantes são utilizados para o tingimento de couro, juta (fibra têxtil vegetal), algodão, papel e como componentes das tintas em fitas, pastas esferográficas, óleos e ceras (Reife e Freeman, 1996; Hunger, 2003; IARC, 2010).

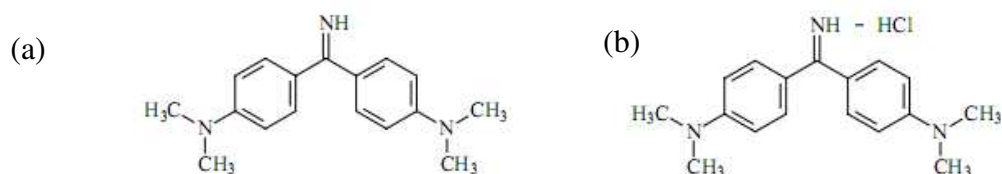


Figura 1. Estruturas químicas dos corantes: auramina (a) e hidrocloreto de auramina (b).

Em 1993, cerca de 9000 toneladas de corantes difenilmetanos e trifenilmetanos foram vendidas, de acordo com IARC (2010). Cristal violeta, violeta de metilo, verde malaquita, auramina, e Rhodamine B são alguns exemplos de corantes destas classes e com grande importância econômica (IARC, 2010).

A produção do corante auramina e seu sal iniciou-se na Europa (Suíça, Alemanha, Reino Unido e França), e depois começou a ser fabricada nos EUA também. A *International Agency for Research on Cancer* (IARC), classifica o auramina em relação a sua produção (Grupo

1, cancerígeno para humanos) e o seu uso (Grupo 2B, possível cancerígeno para humanos) (IARC, 2010). Devido a sua reconhecida carcinogenicidade a fabricação do corante auramina e seu sal foi proibida desde 2004 na Europa e Estados Unidos e atualmente a produção está localizada principalmente na Índia e China (IARC, 2010). Não há dados atuais sobre a quantidade fabricada deste corante e nem dados publicados sobre a ocorrência de auramina em matrizes ambientais, tais como água, efluentes e solo. Porém, apesar de ser proibido o seu uso como corante alimentício, trabalhos recentes mostraram que os mesmos foram encontrados em alimentos (Tripathi *et al.*, 2007; Lin, 2007; Li *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014).

No Brasil, o corante auramina é fabricado em uma indústria de corantes para tecidos localizada em Caieiras, São Paulo, e vendido por uma empresa no estado do Paraná (Nitrogenius, 2015), porém não há informação de mercado em relação à proporção na qual o mesmo vem sendo utilizado. No entanto, não devemos ignorar a possibilidade deste contaminante estar presente em nossos corpos d'água.

2.2 CORANTES: Como chegam ao ambiente e toxicidade para organismos aquáticos

Os corantes estão presentes em praticamente todos os produtos que utilizamos diariamente, como roupas, alimentos, remédios e cosméticos. Esses compostos são essenciais para nossas vidas, porém com o seu grande uso a preservação da qualidade ambiental pode ser afetada, tendo em vista que as tecnologias de tratamentos convencionais utilizadas pelas empresas e pelas estações de tratamento de esgoto não removem por completo substâncias como os corantes. Dessa forma, o ambiente aquático como receptor final dos efluentes industriais está sujeito aos impactos ocasionados por essas substâncias (USEPA, 1989; Guaratini e Zanoni, 2000; Oliveira *et al.*, 2007, Baffana *et al.*, 2011).

Aproximadamente, 15% da produção mundial de corantes são lançados no ambiente durante a síntese, processamento ou aplicação, representando um aporte de cerca de 1,2 toneladas por dia destes compostos (Nam e Rengatnathan, 2000). O tratamento biológico é o método mais utilizado pelas indústrias que fabricam ou utilizam corantes em seus processos, entretanto, a elevada estabilidade de efluentes contendo corantes dificulta a degradação completa por meio deste tratamento, assim, na maioria dos casos, os efluentes tratados são lançados no ambiente com resíduos destes compostos (Umbuzeiro *et al.*, 2005; USEPA, 1989).

Os corantes podem ser classificados como poluentes emergentes. Esta categoria inclui as substâncias que são encontradas no meio ambiente, mas que ainda não estão inseridas em programas de monitoramentos ou legislação pertinente a qualidade ambiental (Horvat *et al.*, 2012).

A Índia e a China estão entre os países que mais utilizam corantes no mundo. No Brasil, não temos um levantamento do uso destes compostos, entretanto, diversos trabalhos

destacam a presença dessas substâncias em corpos d'água (Umbuzeiro *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2007, Carneiro *et al.*, 2010; Zocolo *et al.*, 2015; Vacchi *et al.*, in preparation).

Uma vez que os corantes atingem o ambiente aquático, mesmo que em baixas concentrações, podem causar efeitos adversos aos organismos. Para causar efeitos adversos, os corantes precisam ser absorvidos pelos organismos. Corantes muito solúveis em água tem a tendência de apresentar menor toxicidade, pois geralmente não são absorvidos pelas membranas celulares, já os corantes menos solúveis tendem a ser mais absorvidos pelos organismos, aumentando as chances de causar toxicidade (Klaassen *et al.*, 2013).

A toxicidade de corantes para um mesmo organismo pode variar muito, pois corantes possuem diversas classes químicas designadas para as suas diferentes aplicações. Os resultados da toxicidade de diferentes corantes encontrados na literatura mostrou que a Concentração de Inibição 50% (CI50) para algas pode variar de 0,5 até >100 mg L⁻¹ (Novotný *et al.*, 2006; Vinitnantharat *et al.*, 2008; Luna *et al.*, 2014), para microcústeos a Concentração de Efeito 50% (CE50) variou de 0,02 mg L⁻¹ à >1000 mg L⁻¹ (Walthall e Stark, 1999; Bae e Freeman, 2007; Liu *et al.*, 2007; Verma, 2008; Ferraz *et al.*, 2010; Vacchi *et al.*, 2013;; Luna *et al.*, 2014) e para peixes a Concentração Letal 50 % (CL50) variou de 3,2 à 476,84 mg L⁻¹ (Liu *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2015).

Para o corante auramina, apenas um estudo foi encontrado utilizando o seu sal (hidrocloreto de auramina) em testes com peixes do gênero *Oryzias latipes* e a CL50_{48h} obtida foi de 3,2 mg L⁻¹ (Tonagai *et al.*, 1982).

2.3 OCORRÊNCIA DE CORANTES EM ÁGUAS

Há alguns trabalhos na literatura em que a presença de corantes foi investigada em amostras ambientais, no entanto, devido a forte evidência de contaminação do ambiente por esses compostos, é possível afirmar que ainda são poucos os estudos envolvendo a ocorrência destes contaminantes no ambiente, o que reforça a necessidade de mais pesquisas nesta área.

A verificação da ocorrência de corantes no ambiente necessita de ferramentas analíticas adequadas para detecção em níveis de microgramas ou até mesmo nanogramas por litro. Nestes casos, além das águas superficiais, os efluentes também são analisados, pois é através dos mesmo que ocorre a contaminação. Os trabalhos descritos na literatura que investigaram a presença de corantes em amostras ambientais (águas superficiais e efluentes) usaram predominantemente a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) como método de separação dos analitos de interesse dos demais interferentes presentes nas amostras devido à baixa volatilidade dos corantes (Maguire e Tracz, 1991; Carneiro *et al.*, 2010; Zocolo *et al.*, 2015).

Em um estudo realizado no rio Yamaska em Quebec, Canadá, localizado à jusante de uma indústria têxtil, foram detectados 15 corantes em amostras de águas, sólidos em suspensão e sedimento. Foram investigados 23 corantes de diferentes características: ácidos, básicos, diretos, dispersos, mordentes e reativos, utilizados nas indústrias têxtil do Canadá, o que só foi possível empregando mais de um método analítico. Cromatografia líquida acoplada a detectores de arranjo de diodos (HPLC/DAD) foi a técnica empregada para a maioria dos corantes e, uma minoria foi investigada através de Cromatografia Líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS) e a Cromatografia Gasosa (CG) foi aplicada para análise dos produtos de degradação de corantes, um

detector de ionização de chama (FLO) foi usado para triagem preliminar e espectrometria de massa (MS) para identificação (Maguire e Tracz, 1992).

Estudos realizados na Índia e Nigéria mostraram uma contaminação por compostos genotóxicos em águas subterrâneas na Tirupur, Tamilnadu, Índia, provavelmente aminas aromáticas, como consequência da descarga de efluentes têxteis, no solo e na água. A presença das aminas aromáticas presentes nos efluentes têxteis foi confirmada utilizando Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (Rajaguru *et al.*, 2002).

No Brasil, Umbuzeiro *et al.* (2005) mostraram que três corantes, C.I. Disperse Blue 373, C.I. Disperse Violet 93 e C.I. Disperse Orange 37, detectados no Ribeirão dos Cristais, São Paulo, Brasil, o qual recebia despejos de efluentes têxteis, contribuíam para mutagenicidade observada no local. Posteriormente, Carneiro *et al.* (2010) quantificaram estes mesmos corantes no efluente industrial tratado, nas águas do Ribeirão dos Cristais não tratadas e tratadas para abastecimento e no lodo gerado na estação de tratamento de água para consumo humano em concentrações que variaram de $1,65 \text{ ng L}^{-1}$ a 360000 ng L^{-1} . Os corantes foram quantificados utilizando HPLC/DAD.

Zocolo *et al.* (2015) detectaram 9 corantes dispersos, Red 1, Violet 93, Blue 373, Orange 1, Orange 3, Orange 25, Yellow 3, Yellow 7 e Red 13 em águas superficiais e efluentes tratados. As amostras de águas superficiais analisadas foram do Rio Piracicaba e Ribeirão dos Cristais e os efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto que trata efluentes têxteis, todas localizadas no estado de São Paulo. Dentre os nove corantes, foram detectados apenas o Disperse Red 1, Disperse Blue 373 e Disperse Violet 93 em concentrações de 84 a 3452 ng L^{-1} . A técnica utilizada para detectar e quantificar os corantes foi Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray (LC-ESI-MS/MS).

Um fator extremamente importante e que devemos ressaltar quando se trata de métodos analíticos químicos, é que nem sempre as amostras reais podem ser avaliadas diretamente pelas técnicas de análise, sendo necessária uma etapa de preparo de amostra com a finalidade de remover interferentes que possam afetar tanto a detecção do analito, quanto o instrumento, além de concentrar o analito de modo a melhorar a detectabilidade do método. Amostras complexas, como são os casos de águas superficiais e efluentes, devem ser cuidadosamente preparadas utilizando procedimentos adequados (Jardim, 2010). Na literatura, dois tipos de preparo de amostra foram usados para extrair corantes de águas superficiais e efluentes: a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid Liquid Extraction*) (Rajaguru *et al.*, 2002, Umbuzeiro *et al.*, 2005, Oliveira *et al.*, 2007, Carneiro *et al.*, 2010) e a Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) (Urquiza *et al.*, 2000; Sahin *et al.*, 2006; Zocolo *et al.*, 2015).

2.4 DERIVAÇÃO DE CRITÉRIO PARA PROTEÇÃO DA VIDA AQUÁTICA

Critérios são valores derivados a partir de informações científicas com a finalidade de proteger a biota aquática. Esses critérios não são considerados padrões legais, entretanto, tais valores poderão ser utilizados pelos tomadores de decisão para estabelecer padrões ou regulamentações sobre a qualidade da água para preservação da vida aquática (SBMCTA, 2011).

No Brasil, os valores numéricos ou padrões utilizados são os mesmos definidos pelos países desenvolvidos e pelas agências internacionais. Devido ao fato do Brasil não possuir uma metodologia estabelecida para derivar seus critérios de qualidade de água para proteção da vida aquática, um protocolo foi proposto pela Sociedade Brasileira de Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental em 2011 (SBMCTA, 2011).

O protocolo de cálculo sugerido no Brasil foi baseado na metodologia adotada pela União Europeia, o qual emprega dados de toxicidade da substância e fatores de avaliação (FA) que variam de 10 a 10000 a depender da qualidade e quantidade dos dados ecotoxicológicos disponíveis (Lepper, 2005). Desta maneira, quanto maior o conjunto e/ou qualidade de dados de toxicidade, maior a confiança para se derivar um critério e menor o fator aplicado. É importante ressaltar que a derivação de critérios é um processo contínuo e à medida que mais dados de toxicidade para organismos de diferentes níveis tróficos, grupos taxonômicos e hábitos de vida estejam disponíveis a confiança aumenta e menores valores de FA serão aplicados (Lepper, 2005; EUROPEAN COMMISSION, 2011; SBMCTA, 2011).

A derivação de critérios de proteção ambiental considera os estudos ecotoxicológicos que visam efeitos como a sobrevivência, desenvolvimento embriolarval, crescimento, inibição da emissão da luz, fertilização e reprodução de organismos aquáticos. Os microcústáceos,

microalgas, bactérias, equinodermos e peixes são organismos-testes utilizados em ensaios ecotoxicológicos aceitos internacionalmente (Lepper, 2005; SBMCTA, 2011).

Para derivação destes critérios o ideal é ter dados de toxicidade crônica em organismos que representem três níveis tróficos (algas, microcrustáceos e peixes) desta maneira um fator de avaliação menor poderá ser aplicado, além disso, o uso de protocolos padronizados internacionalmente e a realização dos ensaios em laboratórios com sistema de qualidade implantada são fatores importantes na confiabilidade dos resultados. Esses critérios, além de auxiliar nas regulamentações também podem subsidiar uma avaliação do risco ambiental da substância (EUROPEAN COMMISSION, 2011; SBMCTA, 2011).

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a toxicidade aguda e crônica do corante auramina utilizando organismos representativos de três níveis tróficos, derivar um critério para proteção da vida aquática e desenvolver um método analítico para determinação deste corante em águas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

O corante auramina utilizado nas análises toxicológicas (Tabela 1) possui 97 % de pureza e foi adquirido da empresa Sigma®. Testes preliminares indicaram que o mesmo apresentava baixa solubilidade nos meios de cultivos, havendo a necessidade da utilização de um solvente. O solvente utilizado foi o Dimetilsulfóxido (DMSO) (grau HPLC, Sigma). Em cada teste foi realizado um controle do solvente com a maior porcentagem de DMSO testada (0,05 % para *D. similis* nos testes agudos e 0,01 % para os demais testes).

Tabela 1. Nomenclatura e propriedades físico-químicas do corante auramina

Número CAS	492-80-8
Nome químico	4,4'-Carbonimidoylbis [N, N-dimethylbenzenamine]
Color Index (CI)	41000 B
Sinônimos	C.I. Solvent Yellow 34; 4,4' dimethylaminobenzophenonimide; 4,4'-(imidocarbonyl)bis(<i>N,N</i> -dimethylaniline); glauramine; Solvent Yellow 34; yellow pyoctanine.
Fórmula molecular	C ₁₇ H ₂₁ N ₃
Massa Molar	267,37 g mol ⁻¹
Solubilidade em água	*24,84 mg L ⁻¹ (25°C)
Pka	10,12
Log K_{ow}	**2,98

Fonte: IARC, 2010; SCIFINDER.* Valor estimado por EPISuite WSKowwin v1.43, **Valor estimado por EPISuite Kowwin vl. 68.

4.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

Os testes foram realizados com diferentes organismos representando três níveis tróficos (Figura 2). *Raphidocelis subcapitata*, *Daphnia similis* e *Hydra attenuata* foram cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental (LEAL) da Faculdade de Tecnologia, e os testes com *Danio rerio* foram realizados em cooperação com o Laboratório de Genética Toxicológica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília em parceria com o Prof^o Dr. César Grisólia e o Dr. Rhaul de Oliveira. Todos os testes foram realizados em triplicada, para aumentar a confiabilidade dos resultados, com exceção do teste crônico com *D. similis*.



Figura 2. Organismos utilizados nos testes ecotoxicológicos: a) *Raphidocelis subcapitata*, b) *Daphnia similis*, c) *Hydra attenuata* e d) *Danio rerio*. Fonte: Acervo LEAL; JOVE Science Education.

O laboratório LEAL trabalha de acordo com a norma NBR ISO 17025:2005 e, mesmo sem acreditação formal, possui protocolos padronizados tanto de cultivo quanto de ensaios. A sensibilidade/qualidade dos organismos cultivados no LEAL é controlada por meio de testes rotineiros utilizando como substância de referência cloreto de sódio (CAS 7647-14-5, NaCl, Sigma®, 99,5 % de pureza). A carta-controle dos testes de sensibilidade para cada organismo-teste pode ser encontrada no ANEXO 1.

4.2.1 Teste de toxicidade crônica com alga *R. subcapitata*

A alga *R. subcapitata* é uma espécie abundante em ecossistemas de água doce e são extramentes importantes, pois representam a base da cadeia alimentar, onde sua falta acarretaria em perturbações à biota aquática, uma vez que as mesmas servem de alimentos para outros organismos (Blaise, 1986).

Os testes foram realizados baseados na OECD nº 201 (OECD, 2006), onde uma população de algas foi exposta a diferentes concentrações do corante (20, 60, 200, 600 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$) diluídas a partir de uma solução estoque preparada com o corante, por um período de 72 horas. Os testes foram realizados em condições de esterilidade em erlenmeyers de vidro contendo 45 mL do meio de cultivo. Os erlenmeyers ficaram sob condições controladas de luminosidade (luz branca, 4000 lux), temperatura (24 a 29 °C) e agitação (160 rpm). A inibição de crescimento foi o indicativo de toxicidade e foi utilizada para determinação da Concentração de Efeito Não Observado (CENO). Para validação dos ensaios o número final de células no controle deveria ser no mínimo 16 vezes maior em relação ao início do teste.

4.2.2 Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis*

Os testes de toxicidade aguda com *D. similis* foram baseados na OECD nº 202 (OECD, 2004). Os organismos (entre 6 e 24 h de idade) foram expostos a cinco concentrações do corante (1000, 1500, 2000, 3000 e 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$) por 48 horas em temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ\text{C}$). Para cada diluição, inclusive nos controles, foram adicionados 20 organismos, escolhidos e distribuídos aleatoriamente em quatro réplicas com volumes iguais a 10 mL, com os recipientes cobertos e sem alimentação. Ao final do ensaio foi registrada a quantidade de organismos imóveis em cada concentração testada, para que seja feito o cálculo da porcentagem

de imobilidade. Os testes só foram validados quando no término do ensaio a porcentagem de organismos imóveis no controle não ultrapassou 10%. Foi utilizado o número de organismos imóveis em cada concentração testada para calcular a concentração que causou efeito em 50% dos organismos (CE50).

4.2.3 Teste de toxicidade crônica com *Daphnia similis*

No teste crônico com *D. similis* avaliou-se a inibição da reprodução a diferentes concentrações do corante auramina (100, 200, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$) durante 14 dias. Este teste foi baseado na norma OECD nº 211 para testes com *Daphnia magna* (OECD, 2011), e adaptado para *D. similis*, de acordo com o seu ciclo de vida (Lameira, 2008). As concentrações escolhidas foram determinadas de acordo com os resultados dos testes agudos. Em cada concentração, inclusive no controle, foram preparadas 10 réplicas com 50 mL de amostra e apenas um organismo por recipiente. O ensaio foi realizado em ambiente com temperatura controlada (21 ± 1 °C), fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 de escuro, com recipientes cobertos, realizando a alimentação a cada 24 horas e a troca total da solução-teste, bem como a contagem do número de neonatas, a cada 48 horas. Ao término do ensaio, somou-se o número de organismos jovens produzidos por réplica. A inibição na reprodução foi o indicativo de toxicidade crônica na amostra. Para a validação do teste, os seguintes parâmetros foram observados nos organismos adultos do controle negativo: a mortalidade não poderia exceder 20%, pelo menos 60% dos organismos apresentarem 3 posturas de filhotes, e produção média de ≥ 23 neonatas por organismo. Neste teste foi utilizado o número de neonatas nascidas em cada concentração e no controle para determinar a CENO.

4.2.4 Teste de toxicidade aguda com embriões de *Danio rerio*

Este teste tem sido utilizado com sucesso a uma grande variedade de substâncias e possui a finalidade de determinar a toxicidade aguda de substâncias químicas em estágios embrionários de peixes (OECD, 2013). O desenvolvimento embrionário do *D. rerio* é semelhante à embriogênese de vertebrados superiores, a qual é rápida e pode ser facilmente acompanhada através do ovo transparente (Kimmel *et al.*, 1995) (Figura 3).

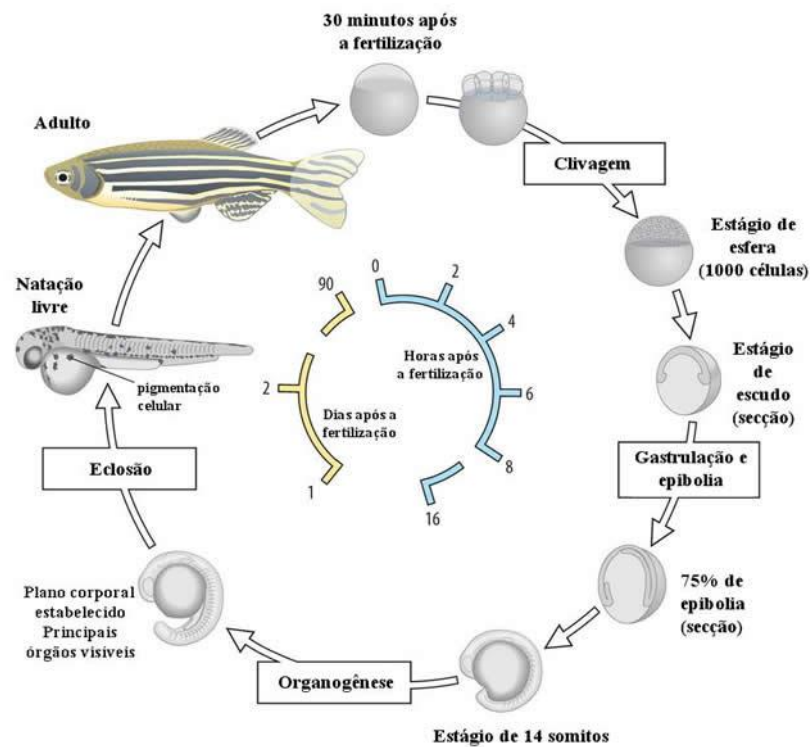


Figura 3. Desenvolvimento do peixe-zebra (*Danio rerio*). Fonte: Moura e Oliveira, 2014.

O teste foi baseado na OECD nº 236 (OECD, 2013) (Figura 4), onde os ovos dos peixes recém fertilizados foram expostos a diferentes concentrações do corante (1000, 1900, 3700, 7100, 13600 e 13600 $\mu\text{g L}^{-1}$) em microplaca de 24 poços. Para cada concentração foram utilizados 20 ovos, um em cada poço contendo 2 mL de solução de exposição. Os testes foram

realizados em câmara climática com temperatura controlada ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) e fotoperíodo de 16 h de luz e 8h de escuro durante 96 h. A cada 24 horas os ovos foram observados utilizando um microscópio invertido, verificando além da letalidade, anormalidades nos embriões ou larvas sobreviventes. Quatro observações apicais foram registradas como indicadores de letalidade: (i) coagulação de ovos fertilizados, (ii) falta de formação de somito, (iii) ausência de descolamento da cauda e (iv) falta de batimentos cardíacos. No final do período de exposição, a toxicidade aguda foi determinada com base no resultado positivo em qualquer uma das quatro observações registradas, os dados letais foram utilizados para calcular a Concentração Letal a 50 % dos organismos (CL50) e os subletais para calcular a CENO. É importante ressaltar que o teste foi validado quando não ocorreu mais de 10% de morte no controle.

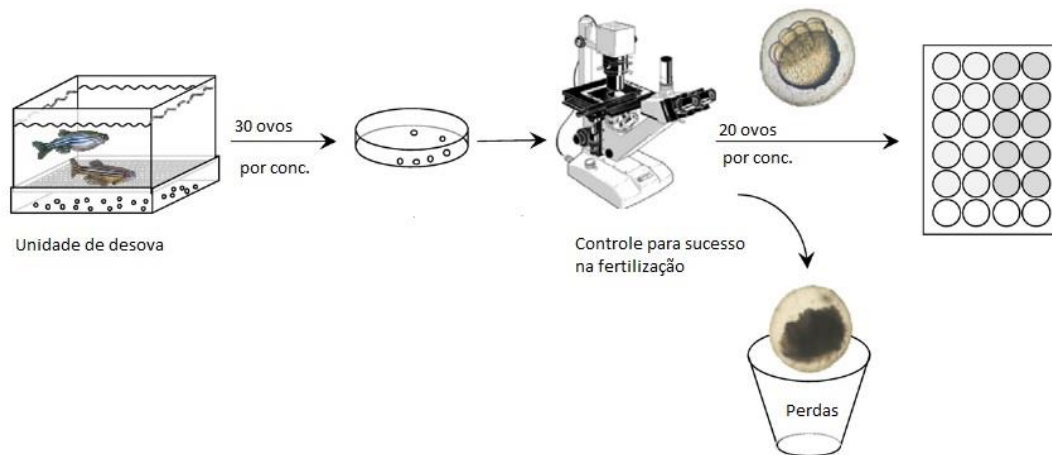


Figura 4. Esquema do procedimento adotado no teste com embrião de *Danio rerio*. (da esquerda para a direita): produção, coleta e lavagem de ovos, seleção de ovos fertilizados com auxílio de microscópio binocular e distribuição em placas de 24 poços preparadas com as respectivas soluções teste. (Fonte: Adaptado de Lammer *et al.*, 2009).

4.2.5 Teste de toxicidade aguda com *Hydra attenuata*

Em *hydras*, sabe-se que progressivas alterações morfológicas são indicativas de aumento na toxicidade. Neste trabalho, o teste foi baseado em Trottier *et al.* (1997), o qual determina que cinco estágios de alterações morfológicas sejam avaliadas. Na Figura 5 pode-se observar *Hydras* no seu estágio normal (A) com corpo e tentáculos estendidos; o aparecimento de bulbos nas pontas dos tentáculos (B), indicando o primeiro sinal de intoxicação; o segundo sinal de intoxicação, com o encurtamento de tentáculos e corpo (C); o corpo no formato tulipa (D), tentáculos e corpo reduzido drasticamente, esta última fase de intoxicação leva à morte por desintegração (estágio E). Os Estágios B e C são reversíveis e são considerados efeitos sub-letais, enquanto os estágios D e E são irreversíveis e indicam endpoints letais.

Organismos jovens e sem brotos foram expostos a diferentes concentrações do corante auramina (500, 1000, 2000, 3500 e 7000 $\mu\text{g L}^{-1}$) por 96 horas, o mesmo foi realizado em microplaca de 12 poços com capacidade de 5 mL, para cada diluição e controle foram adicionados 9 organismos, divididos em 3 réplicas. O ensaio foi realizado em ambiente com temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 de escuro, com recipientes cobertos e sem alimentação.

A leitura foi realizada após o término das 96 horas, onde as alterações morfológicas observadas nos tentáculos do organismo-teste foram registradas. Os efeitos letais e subletais observados foram utilizados para calcular os valores de CL50 e CENO, respectivamente.



Figura 5. Mudanças morfológicas em *Hydra attenuata*: A) estágio normal, B) bulbo nos tentáculos, C) tentáculos encurtados, D) tulipa e E) desintegração. Fonte: Trottier *et al.*, 1997.

4.2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICA

Os resultados dos testes realizados mais de uma vez foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) a um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$) com a finalidade de verificar se havia diferença estatisticamente significativa entre os mesmos. Para o cálculo de CE50, CI50 e CL50 foi utilizado o programa *ToxCalcMix* versão 1.0 (Barata *et al.*, 2006) e os valores de CENO foram determinados por meio de ANOVA seguida do teste de comparação de médias múltiplas Dunnett's, ($\alpha=0,05$) utilizando o software SigmaPlot, versão 11.0.

4.3 DERIVAÇÃO DE CRITÉRIO PARA PROTEÇÃO DA VIDA AQUÁTICA

De acordo com a avaliação ecotoxicológica do corante auramina foi possível derivar um critério para proteção da vida aquática, baseando-se no protocolo da SBMCTA (2011), onde, considerou-se o endpoint de toxicidade mais sensível e aplicou-se um fator de avaliação (FA) para extrapolar uma concentração que proteja o ambiente. Na Tabela 2 pode-se observar quais fatores de avaliação deverão ser aplicados de acordo com o conjunto de dados disponíveis.

Tabela 2. Conjunto de dados necessários e seus respectivos fatores de avaliação utilizados para derivar critérios de qualidade para água doce.

Conjunto de dados	Fator de Avaliação (FA)
Três CENO pelo menos para três espécies (peixes, invertebrados, algas) representando três níveis tróficos	10
Duas CENO para espécies de diferentes níveis tróficos (peixes e/ou invertebrados e/ou algas)	50
Uma CENO (peixes ou invertebrados)	100
Pelo menos uma C(E)L50 de cada um dos três níveis tróficos do conjunto de dados (peixes, invertebrados, algas)	1000

Fonte: SBMCTA, 2011.

4.4 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE AURAMINA EM ÁGUAS

Não há na literatura um método analítico para determinar o corante auramina em matrizes aquáticas. Neste trabalho foi desenvolvido um método específico para detecção e quantificação deste corante em amostras ambientais empregando extração líquido-líquido (LLE) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detectores de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

4.4.1 Análise Cromatográfica

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica que apresenta robustez e alta sensibilidade para compostos coloridos como são o caso dos corantes (Bonato *et al.*, 2007). A análise cromatográfica foi realizada em um equipamento Shimadzu, modelo SCL10AVP equipado com uma coluna de guarda Shim-pack G-ODS(4) octadecil de 4 mm de diâmetro interno, marca Shimadzu e uma coluna de separação de fase reversa Shiseido modelo CAPCLLE PAK C18 AG120 S -5 µm, de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, acoplado com detector de arranjo de diodos modelo SPD-M10VP Shimadzu.

No desenvolvimento do método analítico alguns parâmetros foram analisados como: constituição da fase móvel (FM), vazão da fase móvel e tipo de eluição (gradiente ou isocrático). A escolha dos melhores parâmetros para o método cromatográfico foi realizada com base na comparação dos diferentes cromatogramas obtidos em 437 nm, que corresponde ao comprimento de onda de máxima absorção para o corante auramina. Para definir a melhor composição para a FM foram observados os cromatogramas obtidos com: metanol e água; metanol e água acidificada; acetonitrila e água; acetonitrila e água acidificada. A acidificação da fase móvel foi

feita com o ácido fórmico (Fluka, p.a. 98 % de pureza). O tipo de eluição foi determinado observando a forma do pico e o tempo de retenção, optando por aquele com menor tempo de corrida (o que proporciona maior rapidez para a análise) e, aquele que apresentou o pico mais simétrico possível (evitando a presença de caudas). Em todas as medidas o volume de injeção foi de 20 µL. Os solventes orgânicos e a água utilizados como FM foram filtrados por um sistema de filtração a vácuo utilizando filtros de nylon de 0,22 µm (Whatman®) para os solventes e membranas de papel (Sartorius Stedim Boitech®) com 0,22 µm na filtragem da água.

4.4.2 Extração líquido-líquido

A LLE é uma técnica de separação que já foi utilizada como preparo de amostras ambientais com a finalidade de detectar corantes (Rajaguru *et al.*, 2002, Umbuzeiro *et al.*, 2005, Oliveira *et al.*, 2007, Carneiro *et al.*, 2010). A mesma é baseada na separação da amostra em duas fases que não se misturam, portanto esta técnica só se torna uma ferramenta útil quando há afinidade do analito pelo solvente de extração. Cada substância possui um coeficiente de partição (K_{ow}) que quanto maior for, maior será a afinidade do composto pela fase orgânica e melhor a eficiência na extração. O corante auramina possui um log Kow de 2,98, o que mostra que este composto possui mais afinidade pela fase orgânica e, portanto, espera-se que a LLE apresente boa eficiência para extrair este corante em amostras ambientais.

O método testado foi baseado em Dutka *et al.*, (1981) utilizando como fase orgânica, metanol (CAS 67-56-1, Sigma-Aldrich, grau HPLC, pureza $\geq 99,9\%$) e diclorometano (CAS 75-09-2, Macron, grau HPLC, pureza 99,5%) na proporção 1:2,5 (v/v).

4.4.3 Parâmetros verificados

Para garantir que um método analítico desenvolvido gere informações confiáveis ele deve passar por um processo de validação. A validação é um processo contínuo que se inicia no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo seu desenvolvimento e transferência (Ribani *et al.*, 2004). No Brasil existem duas agências credenciadoras responsáveis por verificar a competência dos laboratórios de ensaio, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Neste trabalho, não foi realizada uma validação completa do método, uma vez que o mesmo não foi aplicado em amostras reais. Entretanto, algumas figuras de méritos consideradas mais importantes, tais como, linearidade, limites de detecção/quantificação e eficiência da extração foram verificadas.

4.4.3.1 Linearidade

Linearidade é a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do composto de interesse, a mesma foi obtida por meio do coeficiente de correlação (R) da equação da curva analítica. A resolução RE 899 da ANVISA que recomenda como critério mínimo um coeficiente de correlação (r) igual a 0,99 e o documento do INMETRO DOQ-CGCRE-008, $r > 0,90$. Neste trabalho, a linearidade foi determinada por meio da curva analítica. As soluções foram preparadas em metanol/água 50:50 (v/v). A partir da solução estoque de 400 mg L^{-1} do corante auramina foram preparados cinco soluções de trabalho (1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 mg L^{-1}). A faixa de trabalho foi, portanto, de 0,01 a $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ não considerando o fator de concentração da amostra, que neste trabalho foi de 1000 vezes.

4.4.3.2 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do composto em análise que pode ser detectada e o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração que pode ser quantificada. Esses limites podem ser calculados de três maneiras, pelo método visual, método relação sinal-ruído ou no método baseado na curva analítica. O limite de detecção do corante auramina foi definido por meio do método visual, onde concentrações conhecidas do corante foram injetadas em ordem decrescente até a visualização da menor concentração e, para o limite de quantificação foi considerado um valor 10 vezes maior que o LD (Ribani *et al.*, 2004).

4.4.3.3 Eficiência da extração

A eficiência da extração foi avaliada através do ensaio de recuperação estimado pela análise de amostras contendo quantidades conhecidas do corante auramina e calculada segundo a expressão: $R (\%) = 100 \times \frac{X \text{ adicionado}}{X \text{ obtido}}$, sendo que os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de compostos em concentrações-traços devem estar entre 70 e 120%.

Para análise deste parâmetro as extrações foram realizadas utilizando funil de separação de 2 L, para cada litro de amostra adicionou-se 60 mL de da mistura de solventes. A mistura foi agitada por 2 minutos e deixada em repouso por 10 minutos, tempo necessário para ocorrer a separação completa das fases. A fase orgânica foi passada por um funil contendo lã de vidro e sulfato de sódio, para retirada de possíveis resíduos de água da fase orgânica, e depois recolhida em um frasco âmbar de vidro. Tal procedimento foi repetido por mais duas vezes, totalizando um volume de aproximadamente 180 mL de extrato orgânico. Um evaporador rotativo com temperatura de aproximadamente 40 °C foi utilizado para reduzir o extrato em 3 mL

e depois, o mesmo foi seco com fluxo de nitrogênio (White Martins, pureza 4.6 FID) e armazenada sob refrigeração (4 °C) até a análise.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO CORANTE AURAMINA

Os organismos utilizados nos ensaios de toxicidade com o corante auramina encontravam-se saudáveis, uma vez que, todos os resultados dos testes de sensibilidade estavam dentro das faixas aceitáveis apresentados nas cartas controle (Anexo I).

Para os testes que foram realizados mais de uma vez, os dados foram submetidos a uma análise de variância e foi verificado que não havia diferença estatística significativa entre os testes ($p > 0,05$); devido a isso, os mesmos foram agrupados e expressos em um único resultado (Figuras 6, 7, 8 e 10). Os dados brutos dos experimentos podem ser consultados no Anexo II.

Algas, juntamente com os microcústáceos da ordem Cladocera, vêm sendo os organismos mais utilizados para avaliar a toxicidade de corantes (Walthall and Stark, 1999; Novotný *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2007; Verma, 2008; Bergsten-Torralba *et al.*, 2009; Ferraz *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2014, Vacchi *et al.*, 2013; Vacchi *et al.*, in preparation). Para auramina, dentre os organismos testados, a alga *R. subcapitata* mostrou ser o organismo mais sensível (Figura 6), no entanto, estudos anteriores com outros corantes, mostraram que em geral a *R. subcapitata* possuía baixa sensibilidade para estes tipos de compostos ($CI_{50_{72h}}$ de 4800 a $>100000 \mu\text{g L}^{-1}$) (Novotný *et al.*, 2006; Vinitnantharat *et al.*, 2008 Luna *et al.*, 2014). Devido a isso, os dados obtidos neste trabalho sugerem a auramina como o corante mais tóxico para a alga *R. subcapitata*.

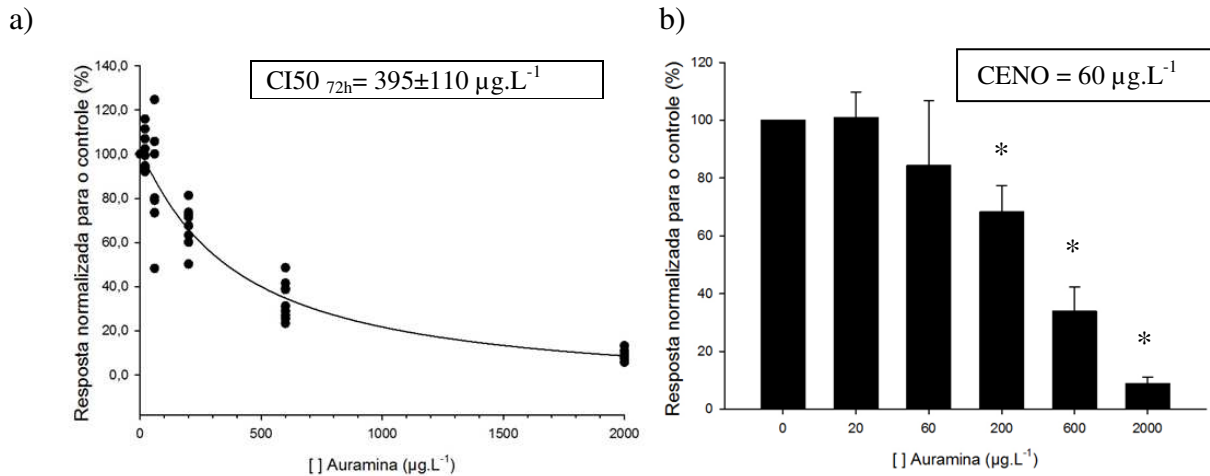


Figura 6. Resultados do teste de toxicidade do corante auramina para *R. Subcapitata* (72 horas de exposição, $n=3$). a) Curva dose resposta dos testes agrupados para cálculo da concentração que inibiu 50% o crescimento celular das algas ($\text{CI50}_{72\text{h}}$), e seu intervalo de confiança de 95%; b) Média do crescimento celular em cada concentração testada, o desvio padrão é indicado acima de cada barra e * refere-se a diferença significativa a partir do controle ($p < 0,05$), utilizado para a determinação da concentração de efeito não observado (CENO).

Nos testes com *D. similis* (Figura 7) o endpoint mais sensível ao corante auramina foi a reprodução ($\text{CENO}=500 \mu\text{g L}^{-1}$) (Figura 7b). A avaliação da toxicidade de outros corantes para essa espécie de microcrustáceos foi baseada apenas em testes agudos (Ferraz *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2014, Vacchi *et al.*, 2013).

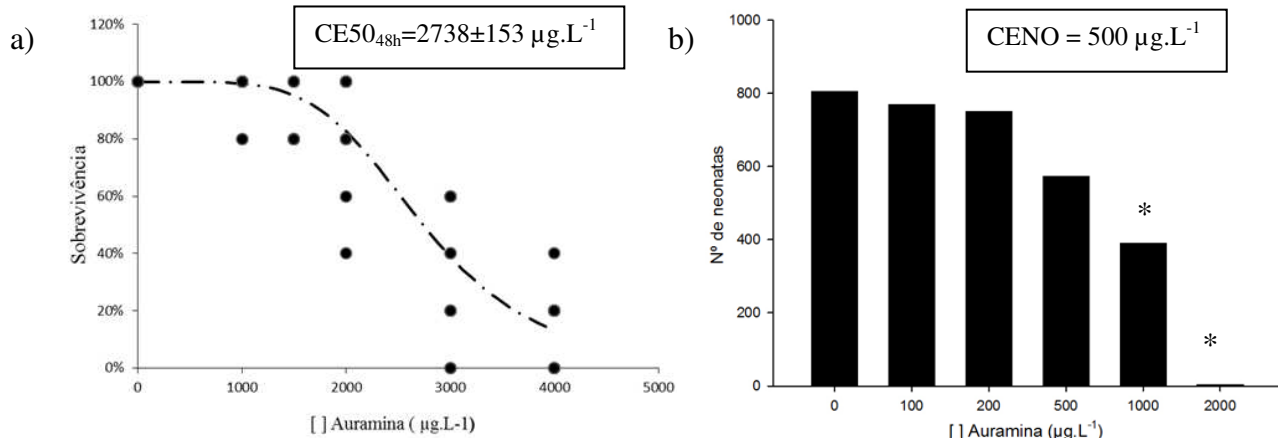


Figura 7. Resultados dos testes de toxicidade do corante auramina para *D. similis*. a) Curva dose resposta dos testes agrupados para cálculo concentração de efeito a 50% dos organismos ($\text{CE50}_{48\text{h}}$), e intervalo de confiança de 95% ($n=3$); b) Total de neonatas produzidas após 15 dias de exposição, * refere-se a diferença significativa a partir do controle ($p < 0,05$), utilizado na determinação da concentração de efeito não observado (CENO).

Para *H.attenuata* e *D.rerio*, além da mortalidade (Figuras 8a e 10) efeitos subletais também foram observados (Figuras 9, 11 e 12) .

Nos testes com *H. attenuata*, para o cálculo da $CL_{50_{96h}}$ somente os efeitos irreversíveis foram considerados (estágio D e E) e para determinar o valor de CENO (Figura 8b) todos os efeitos foram considerados. De acordo com a $CL_{50_{96h}}$ de $4955 \pm 446 \mu\text{g L}^{-1}$, *H. attenuata* representa o organismo mais resistente a esse corante.

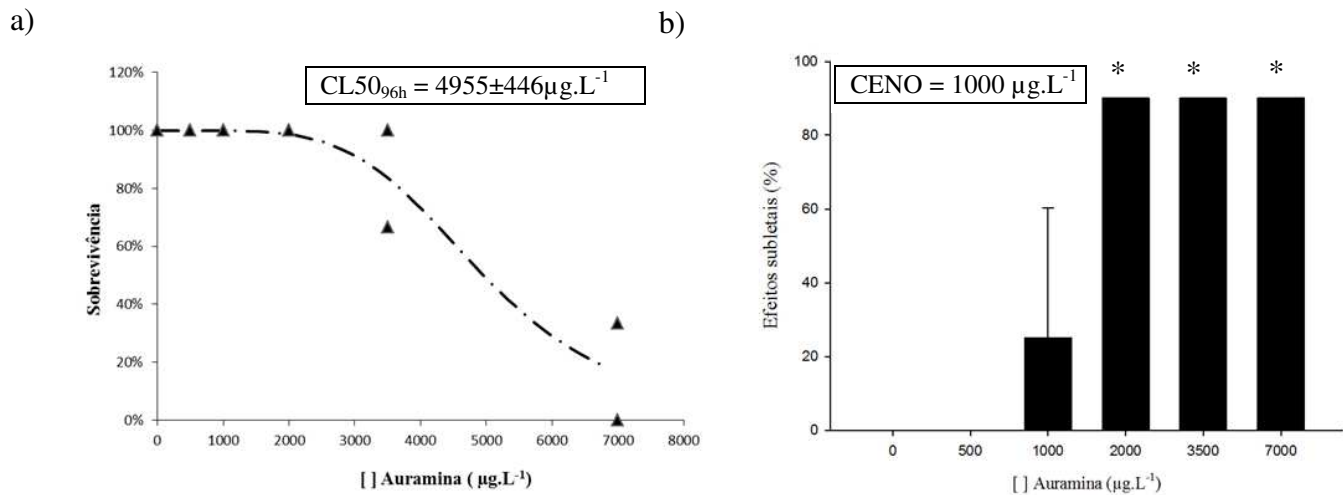


Figura 8. Toxicidade do corante auramina para *Hydra attenuata* (n=3); a) Curva dose resposta dos testes agrupados para determinação da concentração letal a 50% do ($CL_{50_{96h}}$) com intervalo de confiança de 95%, b) Determinação da concentração de efeito não observado (CENO): Média da porcentagem de efeitos em cada concentração testada, o desvio padrão é indicado acima de cada barra e * refere-se a diferença significativa a partir do controle ($P < 0,05$).

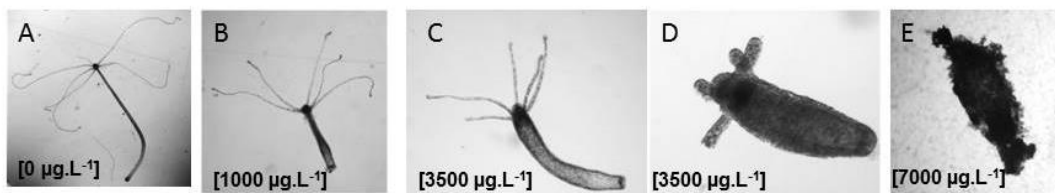


Figura 9. Efeitos do corante auramina observados na morfologia dos tentáculos das *hydras* pós 96 horas de exposição. A) *Hydra* normal, B) Bulbo nos tentáculos, C) Tentáculos encurtados com bulbos, D) Tulipa, E) Desintegrado.

A partir dos testes com o peixe *D. rerio*, foi possível determinar uma $CL_{50_{96h}}$ de $1758 (\pm 45) \mu g L^{-1}$ (Figura 10), mostrando que dentre os consumidores secundários, os peixes foram mais sensíveis para o corante auramina. *Oryzias latipes* foram utilizados para verificar a toxicidade do corante auramina na sua forma ionizada (hidroclorato de auramina) por Tonagai *et al.* (1982) e apesar de serem espécies de peixes diferentes, a toxicidade foram similares em um mesmo período de exposição, $CL_{50_{48h}}$ de $3200 \mu g L^{-1}$ para o *Oryzias latipes* e $CL_{50_{48h}}$ de $2759 \mu g L^{-1}$ para *D. rerio*.

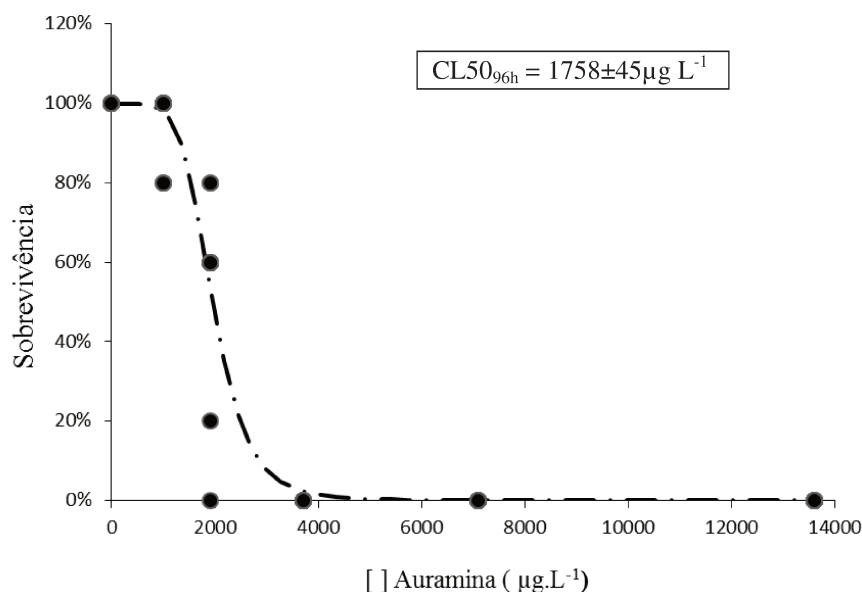


Figura 10. Curva dose resposta dos testes agrupados para determinação da concentração letal a 50% dos embriões de *D. rerio* após 96 horas de exposição ao corante auramina, com intervalo de confiança de 95% (n=3).

A toxicidade aguda no desenvolvimento embrionário de *D. rerio* para três corantes, Básico Violet 14, Direto Red 28 e Ácido Red 26 foram avaliadas por Shen *et al.* (2015), obtendo CL_{50} de 60,63; 476,84 e $2500 mg.L^{-1}$, respectivamente, mostrando que o auramina pode ser até 1000 vezes mais tóxico que outros corantes para essa espécie de peixe.

Anormalidades no desenvolvimento embrionário foram observadas a cada 24 horas (Figura 11). A diminuição nos efeitos a partir de 48 horas é devida à morte dos embriões, sendo assim somente os efeitos subletais estão relatados na Figura 11. Os efeitos mais frequentes foram edemas e curvatura na calda, tais efeitos, aparecem desde o primeiro dia de exposição permanecendo até o último, nas primeiras 24 horas observou-se apenas nas concentrações mais altas e com o aumento do período de exposição até na menor concentração testada os mesmos consistiam. Os edemas foram observados em várias partes dos embriões: cabeça, calda, e perto do coração (Figura 12). O endpoint edema cardiovascular também foi observado por Shen *et al.* (2015), após avaliar a toxicidade de outros corantes cancerígenos, entretanto, esse efeito só foi relatado em concentrações superiores a $2500 \times 10^3 \mu\text{g L}^{-1}$ e para o corante auramina na concentração $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ esse efeito já era notado. Não foi possível determinar um valor de CENO, pois no término do teste 100% dos organismos apresentavam algum tipo de efeito até na primeira concentração, devido a isso, a CENO foi considerado como sendo $< 1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 11 e 12).

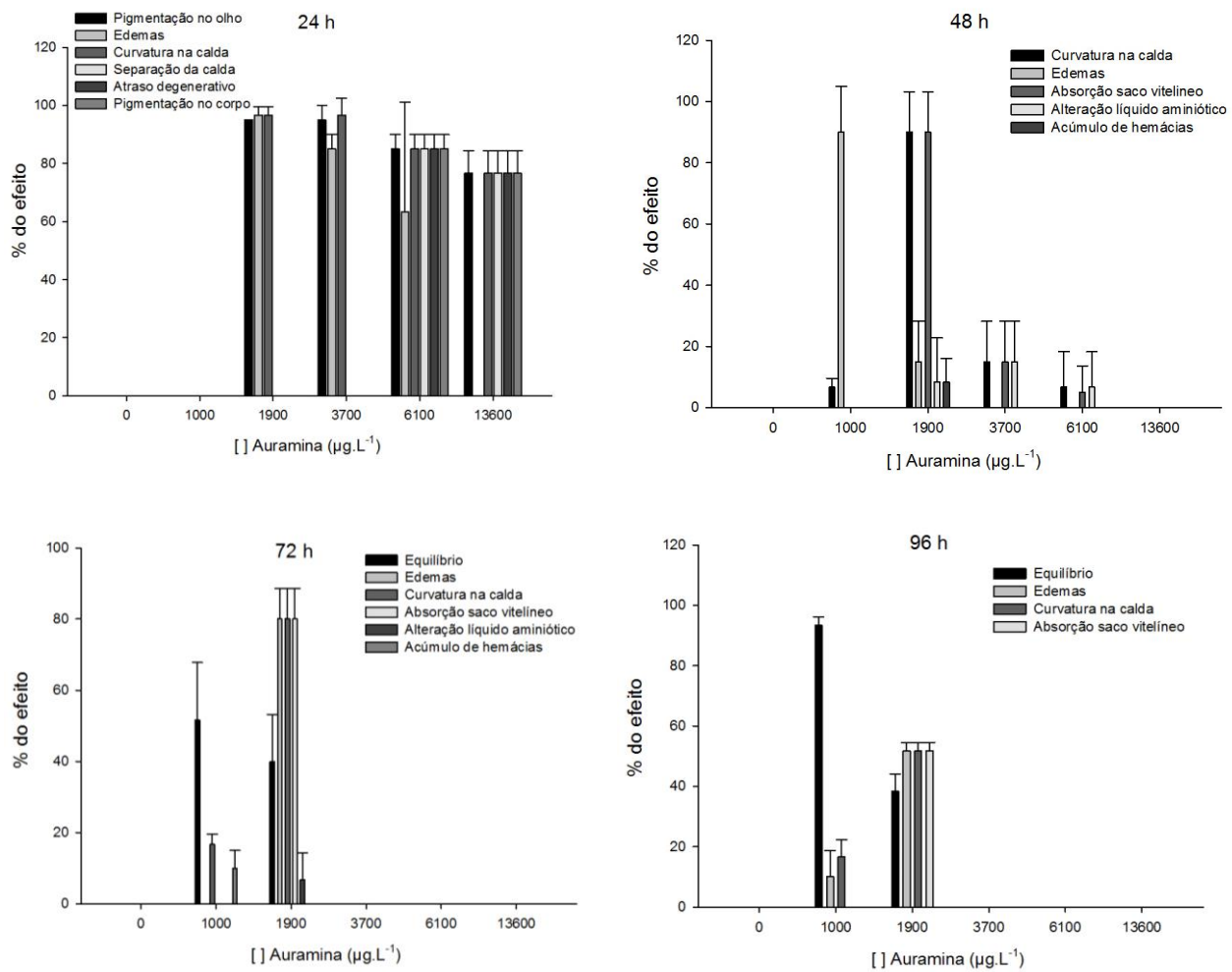


Figura 11. Anormalidades observadas nos embriões de *D. rerio*. Média da porcentagem de organismos com anormalidades após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição ao corante auramina em cada concentração testada (n=3), o desvio padrão é indicado acima de cada barra.

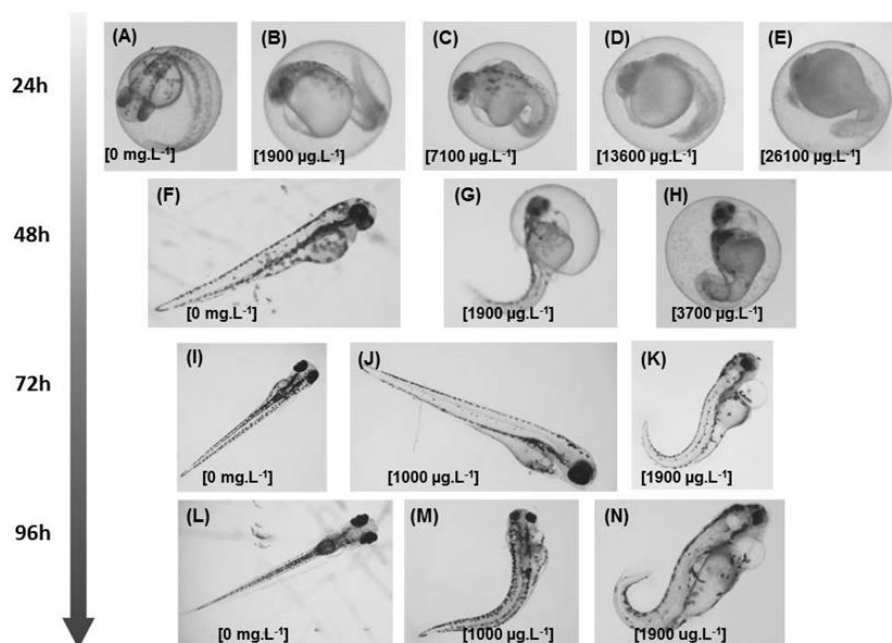


Figura 12. Anormalidades nos embriões de *D. rerio* a cada 24 horas de exposição ao corante auramina. Efeitos observados em cada concentração: A) Embrião normal. B) Curvatura da calda. C) Curvatura da calda e edemas. D) Curvatura da calda e má formação dos olhos. E) Má formação da cabeça e da calda. F) Larva normal. G) Curvatura da calda e edemas cardiovascular. H) Atraso na eclosão, alteração no líquido amniótico e edema cardiovascular. I) Larva normal. J) Alteração no equilíbrio. K) Curvatura da calda, edema cardiovascular e absorção do saco vitelíneo. L) Larva normal. M) Curvatura da calda, absorção do saco vitelino edema cardiovascular e na cabeça. N) Curvatura da calda, edemas (Cardiovascular cabeça) e absorção do saco vitelíneo.

Após a avaliação da toxicidade do corante auramina frente a organismos de diferentes níveis tróficos (Tabela 3) foi possível classificar a toxicidade do mesmo baseando-se no Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) (UNITED NATIONS, 2013), que classifica compostos químicos embasados no seu perigo, mostrando que o corante auramina pode ser classificado como muito tóxico em relação aos efeitos crônicos e como tóxico em relação aos efeitos agudos.

Tabela 3. Resultados dos testes ecotoxicológicos com o corante auramina.

ORGANISMOS	ENDPOINT	EXPOSIÇÃO	RESULTADOS ($\mu\text{g L}^{-1}$)
<i>R. subcapitata</i>	Inibição do crescimento	72 horas	CI50 ^a = 395±110*
	Inibição do crescimento	72 horas	CENO ^b = 60
<i>D. similis</i>	Imobilidade	48 horas	CE50 ^c = 2738±153*
	Reprodução	15 dias	CENO = 500
<i>H. attenuata</i>	Letalidade	96 horas	CL50 ^d = 4955±446*
	Efeitos subletais	96 horas	CENO = 1000
<i>D. rerio</i>	Letalidade	96 horas	CL50 = 1758±45*
	Anormalidades	96 horas	CENO = <1000

^aCI50: Concentração de inibição 50%, ^bCENO: Concentração de efeito não observado, ^cCE50: ^dConcentração de efeito 50%, CL50: ^dConcentração letal 50%. * Valores referentes ao intervalo de confiança 95%.

5.2 DERIVAÇÃO DO CRITÉRIO PARA PROTEÇÃO DA VIDA AQUÁTICA

Um critério para proteção da vida aquática de $1,2 \mu\text{g L}^{-1}$ foi derivado com base no endpoint mais sensível observado nos testes com o corante auramina (CENO para *R. subcapitata* de $60 \mu\text{g L}^{-1}$), dividido por um fator de avaliação de 50. O FA de 50 foi empregado, pois, mesmo com valores de CENO para três níveis tróficos, não foram realizados testes crônicos com peixes. Entretanto, é importante ressaltar que o protocolo de derivação é um processo contínuo que deve ser revisado assim que novos dados estiverem disponíveis. O critério derivado para o corante auramina poderá ser comparado com dados de ocorrência em águas superficiais e verificar se há ou não um risco para os organismos na qual estarão expostos a esta substância.

5.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO CORANTE AURAMINA EM ÁGUAS

5.3.1 Análise Cromatográfica

A fim de se definir as melhores composições da fase móvel, diferentes cromatogramas foram avaliados tanto no modo isocrático quanto no modo usando gradiente de concentração em função da porcentagem aquosa da fase móvel. Usando os parâmetros como tempo de retenção (T_R), fator constante de retenção (k) e resolução entre os picos foi possível concluir que a melhor condição de eluição e FM foi obtida por uma corrida isocrática com fase móvel metanol/água acidificada (0,1%) 50:50 (v/v) em vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. O tempo total de cada análise foi de 15 minutos e os cromatogramas foram avaliados em 437 nm, comprimento de onda de máxima absorção do corante auramina. A Figura 13 mostra o cromatograma obtido nas condições escolhidas e o espectro de absorção do corante auramina obtidos por DAD, na injeção de um padrão com concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. A identificação do pico foi baseada no tempo de retenção de $7,66 \pm 0,42$ minutos.

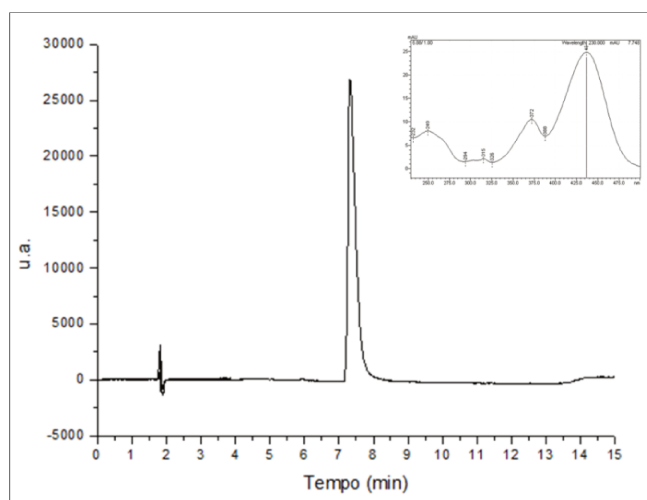


Figura 13. Cromatograma e espectro de absorção do corante auramina obtidos por HPLC-DAD para um padrão de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

5.3.2 Parâmetros verificados

A linearidade do método desenvolvido foi verificada através do coeficiente de correlação (r) obtidos da curva analítica. Na Figura 14 podemos observar que o R^2 foi maior que 0,99; mostrando que o método empregando HPLC-DAD na detecção de auramina em águas, atendeu tanto as exigências da ANVISA, quanto do INMETRO.

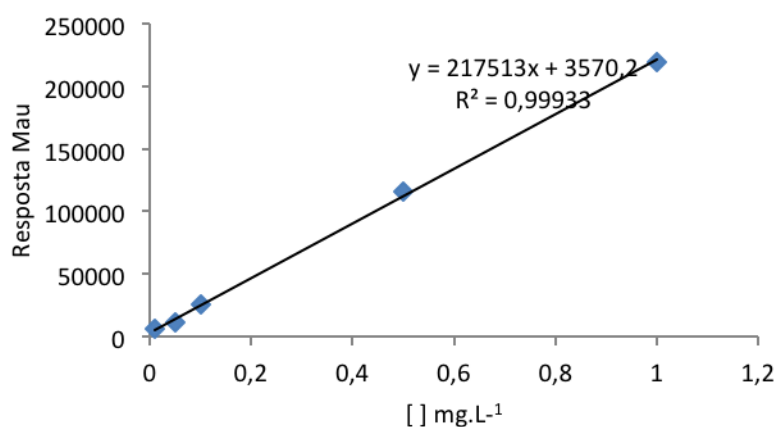


Figura 14. Curva analítica empregando padrões externos em HPLC-DAD construída para o corante auramina.

Definidos através do método visual, os limites de detecção e quantificação determinados foram de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, e considerando amostras com um fator de concentração de 1000 foi possível estimar um limite de detecção de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ e de quantificação de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Para futuras avaliações de risco do corante auramina tais parâmetros de validação deveriam ser inferiores ao critério de proteção da vida aquática e isso foi concretizado com sucesso, pois o limite de quantificação encontrado foi 12 vezes menor que o critério derivado neste trabalho.

A eficiência da extração foi avaliada primeiramente através de um ensaio de recuperação em amostras de águas superficiais coletada no Rio Piracicaba em Americana- São Paulo enriquecida com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ do corante, obtendo uma eficiência na extração de 92%, o que atende as exigências da ANVISA e do INMETRO. Para verificar a eficiência da extração com concentrações mais próximas do critério derivado, o teste de recuperação foi repetido com amostras de água deionizada contendo $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ do corante auramina, neste ensaio a recuperação foi um pouco menor (77%), entretanto continuou atendendo as exigências das agências citadas acima.

Contudo, pode-se afirmar que o método analítico desenvolvido neste trabalho, de acordo com os parâmetros de maiores méritos que foram verificados, mostrou que é capaz de detectar auramina em águas superficiais, além de apresentar um limite de detecção menor que o valor do critério derivado. Entretanto, é importante ressaltar, que este trabalho teve por finalidade proporcionar um passo inicial para outros grupos de pesquisas ou até mesmo agências governamentais que queiram verificar a ocorrência deste corante em águas. Porém, para fins de monitoramento outros parâmetros, tais como seletividade, precisão, exatidão e robustez do método também deverão ser validados (Ribani *et al.*, 2004).

6. CONCLUSÃO

- O organismo que apresentou maior sensibilidade para o corante auramina foi a alga *R. subcapitata*, com valor de CENO de $60 \mu\text{g L}^{-1}$.
- Um critério para proteção da vida aquática de $1,2 \mu\text{g L}^{-1}$ foi derivado, a partir do organismo mais sensível ao corante auramina.
- O método analítico desenvolvido neste trabalho, de acordo com os parâmetros que foram validados, mostrou que ser eficiente na determinação do corante auramina em águas, além de apresentar um limite de detecção menor que o valor do critério derivado.
- O critério derivado e o método desenvolvido poderão auxiliar outros grupos de trabalho ou até mesmo agências governamentais em uma futura avaliação de risco do corante auramina para proteção da vida aquática.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA; Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução - RE no 475, de 19 de março de 2002.

ANVISA; Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução - RE no 899, de 29 de Maio de 2003.

AZEVEDO, F. A; CHASIN, A. M. As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia. Editora Rima (interfox), 2004.

BAE, J. S.; FREEMAN, H. S.; KIM, S. D. Influences of new Azo dyes to the aquatic ecosystem. *Fibers and Polymers*, v.7, p. 30-35, 2006.

BAFANA, A.; DEVI, S.; CHAKRABARTI, T. Azo dyes: past, present and the future. *Environmental Reviews*, v. 370, p. 350–370, 2011.

BARATA, C.; BAIRD, D.J.; NOGUEIRA, A.J.A; SOARES, A.M.V.M.; RIVA, M.C. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. *Aquatic Toxicology*, v. 78, p.1-14, 2006.

BLAISE, C. R. Micromethod for acute aquatic toxicity assessment using the green alga *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology*, v 3, p. 377–385, 1986.

BONATO, P. S.; BRAGA, G. L. COLLINS, C. H. Fundamentos de cromatografia. Editora Unicamp, 2007.

CARNEIRO, P. A.; UMBUZEIRO, G. A.; OLIVEIRA, D. P.; ZANONI, M. V. B.

Assessment of water contamination caused by a mutagenic textile effluent/dye house effluent bearing disperse dyes. *Journal of Hazardous Materials*, v. 174, p. 694-699, 2010.

DUTKA, B.J.; JOVA, A.; BRECHIN, J.. Evaluation of four concentration/extraction procedures on water and effluents collected for use with the *Salmonella typhimurium* screening procedure for mutagens. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 27, p. 758–764, 1981.

EUROPEAN COMMISSION. Common implementation strategy for the water framework directive (2000/60/ec). Guidance document no. 27. Technical guidance for deriving environmental quality standards. European Union. p. 204 , 2011.

FERRAZ, E. R. A.; UMBUZEIRO, G. A.; DE-OLIVEIRA, G.; CALOTO-OLIVEIRA, A.; CHEQUER, F. M.; ZANONI, M. V.; DORTA, D.; OLIVEIRA, D. P. Differential toxicity of Disperse Red 1 and Disperse Red 13 in the Ames test, HepG2 cytotoxicity assay, and *Daphnia* acute toxicity test. *Environmental Toxicology*, v. 26, p. 489-497, 2010.

GODOY, A. A.; KUMMROW, F.; PAMPLIN, P. A. Z. Occurrence, ecotoxicological effects and risk assessment of antihypertensive pharmaceutical residues in the aquatic environment - A review. *Chemosphere*, v. 138, p. 281–291, 2015.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. *Química Nova*, v. 23, p. 71-78, 2000.

HORVAT, A. J. M.; PETROVIC', M.; BABIC', S.; PAVLOVIC', D. M.; AS'PERGER, D.; PELKO, S.; MANCE, A. D.; KAS'TELAN-MACAN, M. Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. Trends in Analytical Chemistry, v. 31, p. 61-84, 2012.

HUNGER, K. Industrial dyes - chemistry, properties, applications. Editora: Wiley-vch, 2003.

IARC, International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Auramina and Auramina production. Em: Some Aromatic Amines, Organic Dyes, and Related Exposures, v. 99, p. 111-140, 2010.

INMETRO; Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos; DOQ -CGCRE-008, 2003.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. Scientia Chromatographica, v.2, p. 13-25, 2010.

JOVE. Science Education Database. Model Organisms II: Mouse, Zebrafish, and Chik. An introduction to the Zebrafish: Danio rerio. Journal of Visualized Experiments.. Disponível em: <http://www.socmucimm.org/introduction-zebrafish-danio-rerio>. Acesso em 04 de Janeiro de 2016.

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T.F. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental dynamics* , v. 203, p. 253-310, 1995.

KLAASSEN, C. D.; CASARETT, L. J.; DOULL, J. Casarett and doull's toxicology : the basic science of poisons. 8th ed., McGraw-Hill Education, 2013.

LAMEIRA, V. Estudo dos efeitos letais e subletais (reprodução e teratogênese) do fármaco triclosan para *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Ceriodaphnia silvestre* (Cladocera, crustácea). Dissertação de Mestrado. Instituto de pesquisas energéticas e nucleares. Autoarquia associada a Universidade de São Paulo.

LAMMER, E.; CARR, G.J.; WENDLER, K. RAWLINGS, J. M.; BELANGER, S. E.; BRAUNBECK, T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 149, p. 196–209, 2009.

LEPPER, P. Manual on the Methodological Framework to Derive Environmental Quality Standards for Priority Substances in accordance with Article 16 of the Water Framework Directive (2000/60/EC). Institute Molecular Biology and Applied Ecology Schmallingenberg, Germany, 2005.

LI, J.; DING, X.M.; LIU, D.D.; GUO, F.; CHEN, Y.; ZHANG, Y.B.; LIU, H.M. Simultaneous determination of eight illegal dyes in chili products by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 942, p. 46– 52, 2013.

LIN, Q. Simultaneous determination of chrysoidine and auramine O in bean products by HPLC. *Chinese Journal of Chromatography*, v. 25, p. 776–777, 2007.

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, p. 2159–2165, 2007.

LUNA, L. A.V.; SILVA, T. H. G.; NOGUEIRA, R. F. P.; KUMMROW, F.; UMBUZEIRO, G. Aquatic toxicity of dyes before and after photo-Fenton treatment. *Journal of Hazardous Materials*. v. 276, p. 332-338, 2014.

MAGUIRE, R.J.; TRACZ, R.J. 1991. Occurrence of dyes in the Yamaska River, Québec. *Water Pollution Research Journal of Canada*, v. 26, p. 145-161, 1991.

MOURA, M. A. M; OLIVEIRA, R. Uso de embriões de peixe-zebra em ecotocologia. Comunicados técnicos. Centro Experimental Central do Instituto Biológico. Disponível em: http://www.biológico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=201#. Acesso em 15 de Janeiro de 2016.

NAM, S.; RENGATNATHAN, V. Non-enzymatic reduction of azo dyes by NADH.

Chemosphere, v. 40, p. 351-357, 2000.

NITROGENIUS. Empresa revendedora de produtos químicos. Disponível em:

<http://www.nitrogenius.com.br/produtos.php?cat=5>. Acesso em 26 de Novembro de 2015.

NOVOTNY, C.; NICOLINA DIAS; KAPANEN, A.; MALACHOVA, K.; VANDROVCOVA, M.; ITAVAARA, M.; LIMA, N. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes. Chemosphere, v. 63, p. 1436-1442, 2006

OECD - Guideline for testing of chemicals. *Daphnia* sp. acute immobilization test. Organization for Economic Co-operation and Development, nº 202, 2004.

OECD - Guideline for testing of chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Organization for Economic Co-operation and Development, nº201, 2006.

OECD - Guidelines for the Testing of Chemical *Daphnia magna* Reproduction Test. Organization for Economic Co-operation and Development, nº211, 2011.

OECD - Guidelines for the Testing of Chemical - Fish Embryo Test (FET). Organization for Economic Co-operation and Development, nº 236, 2013.

OLIVEIRA, D. P.; CARNEIRO, P. A.; SAKAGAMI, M. K.; ZANONI, M. V. B.; UMBUZEIRO, G. A. Chemical characterization of a dye processing plant effluent –identification of mutagenic components. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 626, p. 135-142, 2007.

RAJAGURU, P.; VIDYA, L.; BASKARASETHUPATHI, B.; KUMAR, P.A.; PALANIVEL, M., KALAISELVI, K. Genotoxicity evaluation of polluted ground water in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay. *Mutat. Res.*, v. 517, p. 29– 37, 2002.

REIFE, A.; FREEMAN, H. S. *Environmental Chemistry of dyes and pigments*. A Wiley-Interscience Publication, 1996.

RIBANI, M. BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771-780, 2004.

SAHIN, S.; DEMIR, C.; GUÇER, S. Simultaneous UV-vis spectrophotometric determination of disperse dyes in textile wastewater by partial least squares and principal component regression, *Dyes and Pigments*, v. 73, p. 368-376, 2006.

SBMCTA, Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogenese Ambiental. Protocolo para Derivação de Critérios da Qualidade de Água para Proteção da Vida Aquática no Brasil proposto, 2011.

SHEN, B.; LIU, H.C.; OU, W. B.; EILERS, G.; ZHOU, S.M., MENG, F.G.; LI, C.Q.; LI, Y.Q. Toxicity induced by Basic Violet 14, Direct Red 28 and Acid Red 26 in zebrafish larvae. *Journal of Applied Toxicology*, v. 14, p. 73-80, 2015.

TRIPATHI, M.; KHANNA, S. K.; DAS, M. Surveillance on use of synthetic colours in eatables vis a vis Prevention of Food Adulteration Act of India. *Food Control*, v. 18, p. 211-219, 2007.

TROTTIER, S., BLAISE, C., KUSUI, T., JOHNSON, E. M., Acute Toxicity Assessment of Aqueous Samples Using a Microplate-Based *Hydra attenuate* Assay. *Environmental Toxicology and Water Quality*, v. 12, p. 265 - 271, 1997.

TONOGAI, Y.; OGAMA, S.; ITO, Y.; IWAIDA, M. Actual Survey on TLM (Median Tolerance Limit) Values of Environmental Pollutants, Especially on Amines, Nitriles, Aromatic Nitrogen Compounds. *Journal Toxicology. Science* 7, v. 3, p.193-203, 1982.

URQUIZA, M. P.; FERRER, R. BELTRAN, J. L. Determination of sulfonated azo dyes in river water samples by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 883, p. 277- 283, 2000.

USEPA, 1989. Aerobic and anaerobic treatment of C.I. Disperse blue 79. *US Department of Commerce, National Technical Information Service (NTIS)*, vols.I and II, EPA/600/2-89/051 (PB 90-111642).

US EPA. [2015]. Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft® Windows, v. 1.68. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.

US EPA. [2015]. Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft® Windows, v. 1.43. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.

UMBUZEIRO, G.A., FREEMAN, H.S., WARREN, S.H., OLIVEIRA, D.P., TERAQ, Y., WATANABE, T., CLAXTON, E.L.D. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. *Chemosphere*, v. 60, p. 55–64, 2005.

VACCHI, F. I. Eco/genotoxicidade do corante comercial CI Disperse Red 1 e seus subprodutos clorados. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Tecnologia. Universidade Estadual de Campinas, 2012.

VACCHI, F.I.; ALBUQUERQUE, A.F.; VENDEMIATTI, J.A.S.; MORALES, D.A.; ORMOND, A.B.; FREEMAN, H.S.; ZOCOLLO, G.; ZANONI, M.V.B.; UMBUZEIRO, G.A. Chlorine disinfection of dye wastewater: Implications for a commercial azo dye mixture. *Science of the Total Environment*, v. 442, p. 302–309, 2013.

VACCHI, F.I.; VON DER OHE, P.C.; ALBUQUERQUE, A.F.; VENDEMIATTI, J. A.S.; AZEVEDO, C.C.J.; HONÓRIO, J.G.; SILVA, B.F.; ZANONI, M.V.B.; HEINRY, T.B.; NOGUEIRA, A.J. UMBUZEIRO, G.A. Environmental risk assessment of an azo dye based on toxicity evaluation of the commercial product (In preparation).

VERMA, Y. Acute toxicity assessment of textile dyes and textile and dye industrial effluents using *Daphnia magna* bioassay. *Toxicology and industrial health*, v. 24, n. 7, p. 491–500, ago. 2008.

VINITNANTHARAT, S.; CHARTTHE, W.; PINISAKUL, P. Toxicity of reactive red 141 and basic red 14 to algae and waterfleas. *Water Science & Technology*, v.58, n.6,2008.

WALTHALL, W. .; STARK, J. . The acute and chronic toxicity of two xanthene dyes, fluorescein sodium salt and phloxine B, to *Daphnia pulex*. *Environmental Pollution*, v. 104, p. 207–215, 1999.

WANG, Z.; ZHANG, L.; LI, N.; LEI, L.; SHAO, M.; YANG, X.; SONG, Y.; YU, A., ZHANG, H.; QIU, F. Ionic liquid-based matrix solid-phase dispersion coupled with homogeneous liquid–liquid microextraction of synthetic dyes in condiments. *Journal of Chromatography*, v. 1348, p. 52–62, 2014.

WONG, C. K.; LIU, X. J.; LEE, A. O. K.; WONG, P. K. Effect of azo dyes on survivorship, oxygen consumption rate, and filtration rate of the freshwater cladoceran *Moina macrocopa*. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, v. 12, p. 289–300, 2007.

ZOCOLO, G.J.; SANTOS, G. P.; VENDEMIATTI; VACCHI, F.I. UMBUZEIRO, G.A.; ZANONI, M.V.B. Using SPE-LC-ESI-MS/MS Analysis to Assess Disperse Dyes in

Environmental Water Samples. Journal of Chromatographic Science Advance Access published January, p. 1-8, 2015.

ANEXO 1 - CARTAS CONTROLE DOS ORGANISMOS TESTES

Cada gráfico mostra os resultados de todos os teste expressos em CE50 para *D. similis*, CL50 para *H. attenuata* e CI50 para *R. subcaptata* (Figuras 1, 2 e 3) bem como, a média dos resultados e $\pm$ duas vezes o desvio padrão (DP) da média. Cada carta controle é equivalente ao período na qual os testes com o corante auramina foram realizados.

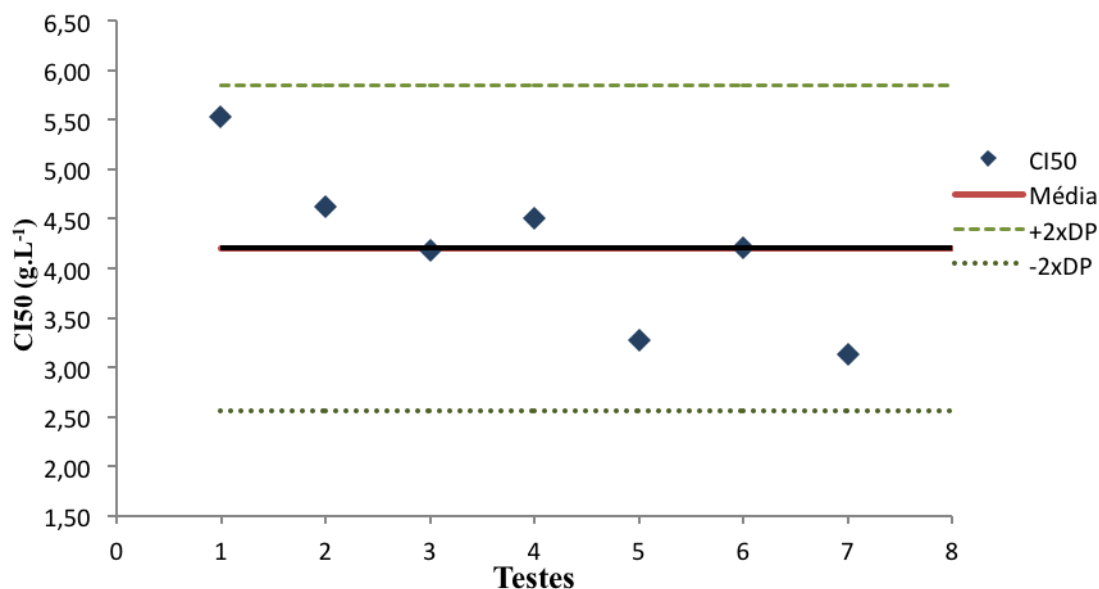


Figura 1. Carta controle dos testes com substância de referência (NaCl) para *R. subcaptata* referente aos anos de 2014 e 2015.

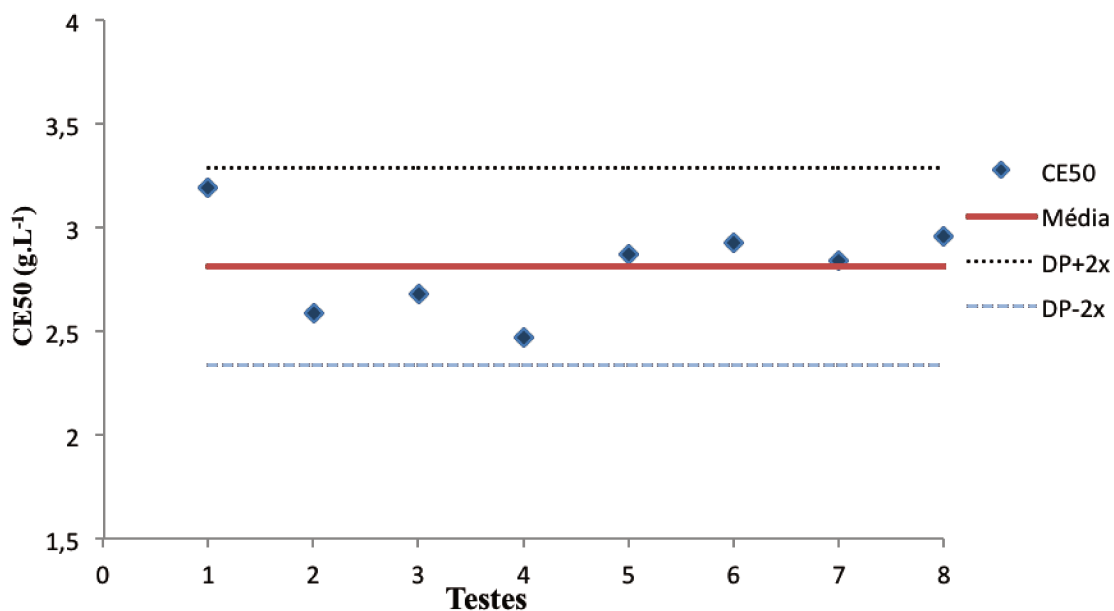


Figura 2. Carta controle dos testes com substância de referência (NaCl) para *D. similis* referente ao ano de 2015.

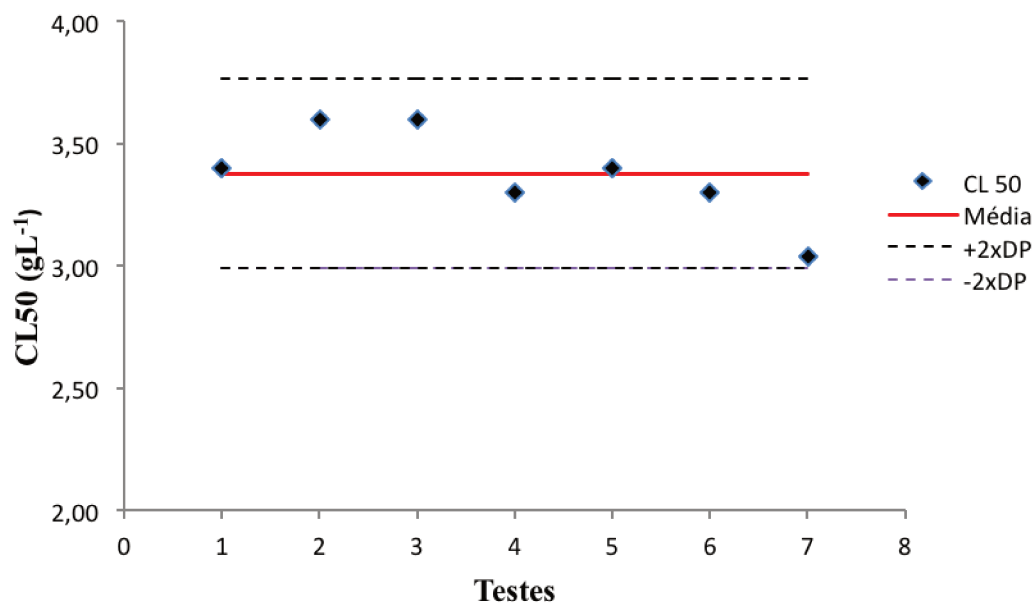


Figura 3. Carta controle dos testes com substância de referência (NaCl) para *H. attenuata* referente ao ano de 2015.

ANEXO 2– DADOS BRUTOS DOS TESTES DE TOXICIDADE

TESTE CRÔNICO COM <i>R. subcapitata</i>			
	Média de células		
Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Teste 1	Teste 2	Teste 3
Solvente	207	211	359
0	212	216	327
20	216	209	333
60	146	233	278
200	130	148	257
600	65	91	96
2000	15	23	29

TESTE AGUDO COM <i>D. rerio</i>			
	% de organismos mortos		
Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Teste 1	Teste 2	Teste 3
Solvente	0	0	0
0	0	0	0
1000	5	5	5
1900	72	40	35
3700	100	100	100
7100	100	100	100
13600	100	100	100

TESTE AGUDO COM *D. similis*

	% de organismos imóveis		
Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Teste 1	Teste 2	Teste 3
Solvente	0	0	0
0	0	0	0
1000	0	5	5
1500	5	5	20
2000	5	5	35
3000	65	55	70
4000	85	80	95

TESTE CRÔNICO COM *D. similis*

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Média de neonatas	Reprodução (%)	Inibição (%)
Solvente	81	99,4	0,6
0	80,5	100	0
100	76,9	95	5
200	75,1	92,7	7,3
500	57,3	70,7	29,3
1000	39,1	48,3	51,7
2000	0,4	0,5	95

TESTE AGUDO COM <i>H. attenuata</i>. (Endpoint: Mortalidade)			
	% de organismos mortos		
Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Teste 1	Teste 2	Teste 3
Solvente	0	0	0
0	0	0	0
500	0	0	0
1000	0	0	0
2000	0	0	0
3500	11	11	22
7000	89	78	100

TESTE AGUDO COM <i>H. attenuata</i>. (Endpoint: Efeitos subletais)			
	% de organismos afetados		
Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Teste 1	Teste 2	Teste 3
Solvente	0	0	0
0	0	0	0
500	0	0	0
1000	0	44	33
2000	100	100	100
3500	100	100	100
7000	100	100	100

