UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE TECNOLOGIA

Gabriel Rampazzo Magalhães

Genotoxicidade *in vivo* do corante natural emodin utilizando um organismo aquático

Limeira
2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE TECNOLOGIA

Gabriel Rampazzo Magalhães

Genoxoticidade *in vivo* do corante natural emodin utilizando um organismo aquático

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental à Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Gisela de Aragão Umbuzeiro

Limeira
2021

Autor: Gabriel Rampazzo Magalhães

Título: Genotoxicidade *in vivo* do corante natural emodin utilizando um organismo marinho

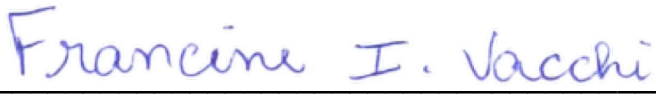
Natureza: Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Ambiental

Instituição: Faculdade de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas

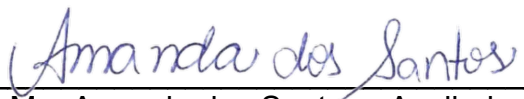
Aprovado em: 06/01/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof.ª Dr.ª Gisela de Aragão Umbuzeiro – Presidente
Faculdade de Tecnologia (FT/UNICAMP)



Dr.ª Francine Inforçato Vacchi – Avaliadora



Me. Amanda dos Santos - Avaliadora

Este exemplar corresponde à versão final da monografia aprovada.

Prof.ª. Dr.ª Gisela de Aragão Umbuzeiro - Orientadora
Faculdade de Tecnologia (FT/UNICAMP)

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o apoio dado e por me incentivarem desde a infância a estudar e adquirir novos conhecimentos. São minha grande inspiração.

À minha namorada, Ana Gabriela Machado, por sempre estar presente e ter me apoiado durante todo o caminho da graduação.

À equipe do Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade da Faculdade de Tecnologia da Unicamp, em especial à Professora Gisela de Aragão Umbuzeiro, por ter aberto as portas e acreditado em nosso trabalho desde o início, bem como à Francine Vacchi e Amanda Santos, por me auxiliarem e contribuírem com meu crescimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, por dar suporte e facilitar o caminho da pesquisa.

E a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte de minha formação, meu muito obrigado.

RAMPAZZO MAGALHÃES, Gabriel. Genotoxicidade *in vivo* do corante natural emodin utilizando um organismo aquático. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Tecnologia. Universidade Estadual de Campinas. Limeira, 2021.

RESUMO

Determiinados corantes naturais têm propriedades genotóxicas. O emodin é uma antraquinona obtida de plantas e fungos, que vem sendo utilizada como corante para tingimento de tecidos e, uma vez que o processo de tratamento dos resíduos em geral não é eficiente na sua remoção, o mesmo pode atingir o ambiente aquático. Ele apresentou genotoxicidade em sistema *in vitro*, e no teste de Ames após ativação metabólica. Estudos sugerem que sua estrutura planar é responsável por causar intercalação no DNA, levando a mutações. Para avaliar a capacidade de causar danos *in vivo* um método eficiente é o ensaio cometa. Neste trabalho escolhemos como organismo-teste o anfípode marinho *Parhyale hawaiensis* para o qual o ensaio cometa já foi validado, e o dano é avaliado nas células de hemolinfa de organismos adultos. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo verificar se o emodin é capaz de causar genotoxicidade *in vivo* utilizando o ensaio cometa. Organismos adultos foram expostos por 96 horas a diferentes concentrações subletais do corante, sendo 12 organismos por concentração, com fotoperíodo 12h/12h. Ao término do período de exposição, realizou-se a coleta da hemolinfa de organismos, e então o processo de cometa alcalino foi conduzido. Por fim, as lâminas foram avaliadas através de fluorescência e o dano ao DNA medido no software Comet Score 2.0. O emodin apresentou genotoxicidade na maior concentração testada para o anfípode marinho *P. hawaiensis*. Este estudo complementa os dados já existentes sobre a genotoxicidade desse composto.

Palavras-chave: Ensaio cometa; DNA; crustáceo marinho; *Parhyale hawaiensis*.

RAMPAZZO MAGALHÃES, Gabriel. *In vivo* genotoxicity of the natural dye emodin using and aquatic organism. 2021. nºf. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Tecnologia. Universidade Estadual de Campinas. Limeira, 2021.

ABSTRACT

Certain natural dyes have genotoxic properties. Emodin is an anthraquinone obtained from plants and fungi, which has been used as a dye for dyeing fabrics and, since the waste treatment process in general is not efficient in its removal, it can reach the aquatic environment. He showed genotoxicity in the *in vitro* system, and in the Ames test after metabolic activation. Studies suggest that its planar structure is responsible for causing DNA intercalation, leading to mutations. To evaluate the ability to cause damage in vivo, an efficient method is the comet assay. In this work, we chose as the test organism the marine amphipod *Parhyale hawaiensis* for which the comet assay has already been validated, and the damage is evaluated in the hemolymph cells of adult organisms. Thus, the present study aimed to verify whether emodin can cause genotoxicity *in vivo* using the comet assay. Adult organisms were exposed for 96 hours to different sublethal concentrations of the dye, 12 organisms per concentration, with a 12h / 12h photoperiod. At the end of the exposure period, the hemolymph was collected from organisms, and then the alkaline comet process was conducted. Finally, the slides were evaluated using fluorescence and DNA damage measured using the Comet Score 2.0 software. Emodin showed genotoxicity in the highest concentration tested for the marine amphipod *P. hawaiensis*. This study complements the existing data on the genotoxicity of this compound.

Keywords: Comet assay; DNA; Marine crustacean; *Parhyale hawaiensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular do emodin 11
Figura 2 - *Parhyale hawaiensis* macho e fêmea ,. 12
Figura 3 - Esquema de um organismo da espécie *Parhyale hawaiensis*. 15
Figura 4 – Média de danos no DNA de *P. hawaiensis* para cada exposição..17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições de cultivo de *Parhyale hawaiensis*. 12

Tabela 2 – Média de danos no DNA e desvio padrão avaliados pelo ensaio cometa em células de hemolinfa de *P. hawaiensis* após exposição ao emodin e controles negativos e positivos e citotoxicidade. 16

SUMÁRIO

1 Introdução 9
2 Objetivo 10
3 Materiais e métodos 10
3.1 Corante e reagentes utilizados 10
3.2 Cultivo de organismos 11
3.3 Teste de toxicidade aguda com emodin 12
3.4 Avaliação da genotoxicidade 13
3.4.1 Exposição dos organismos 13
3.4.2 Citotoxicidade 14
3.4.3 Ensaio Cometa 14
4 Resultados e discussão 15
4.1 Teste de toxicidade aguda com emodin 16
4.2 Genotoxicidade do emodin 16
5 Conclusão 18
6 Referências 19
ANEXO A – Dados brutos de danos no DNA (%) 21
ANEXO B – Parâmetros iniciais e finais das exposições para a realização do ensaio agudo 23
ANEXO C – Parâmetros das exposições para a realização do ensaio cometa. 24
ANEXO D – Carta Controle 25

1 Introdução

Entre os corantes naturais, estão as antraquinonas e seus derivados, como o emodin, que são encontrados em plantas e fungos (DUVAL et al., 2016). Dentre suas aplicações, o emodin é utilizado em cosméticos, no tingimento de produtos alimentícios e como medicamento (BROWN; DIETRICH, 1979). Suas propriedades farmacológicas indicam uma eficiente atuação como anti-inflamatório, anti-alérgico e no tratamento de Alzheimer, dentre outras doenças (DENG et al., 2020).

O emodin demonstrou genotoxicidade *in vivo* em ratos (NESSLANY et al., 2009) e foi identificado como mutagênico *in vitro*, inclusive ao realizar o teste Salmonella/microsome, com a linhagem TA 1537, a qual detecta intercalações no DNA, na presença de ativação metabólica (S9) (BROWN; BROWN, 1976). Uma vez que o corante não causa mutações na linhagem TA 98, seus resultados sugerem que sua estrutura planar é responsável pela intercalação no DNA, resultando em mutações.

Antraquinonas demonstraram mutagenicidade em ratos ao realizar o ensaio Salmonella, indicando que a substância levou ao desenvolvimento de tumor nos organismos expostos (Westendorf et al., 1990). Uma vez que o processo convencional de tratamento de efluentes não é eficaz na remoção de corantes, ao entrarem no ambiente, estes tornam-se uma importante fonte de contaminação (ARORA, 2014), bem como seus produtos de degradação gerarem danos ao ecossistema aquático (CHEQUER et al., 2015), contribuindo com a mutagenicidade de corpos hídricos (UMBUZEIRO et al., 2005, VACCHI et al., 2017).

Danos no DNA são capazes de provocar efeitos adversos na reprodução e crescimento de organismos (HAN et al., 2014), além do desenvolvimento de doenças, como o câncer (FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2009). Assim, é de grande importância a avaliação de seu potencial genotóxico (OSMAN, 2014). O ensaio cometa é um teste utilizado para analisar danos no DNA, sendo este um método relativamente rápido, simples e de baixo custo, onde avalia-se quebras no DNA a partir de células individuais (COLLINS, 2004). Há testes de ensaio cometa realizados com organismos aquáticos, incluindo anfípodas (LEE; STEINERT, 2003; LACAZE et al., 2010), indicando o potencial genotóxico de contaminantes (FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2009).

Dentre os organismos de distribuição circuntropical representantes do litoral

brasileiro, encontra-se o anfípoda marinho *Parhyale hawaiensis*, utilizado em estudos genéticos (STAMATAKI; PAVLOPOULOS, 2016) e testes ecotoxicológicos agudos (ARTAL et al., 2018), sendo também um organismo sensível a respostas ambientais (VACCHI et al., 2019). Organismos adultos de *P. hawaiensis* foram utilizados no presente estudo, pois para este já há ensaio cometa implantado no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade da Faculdade de Tecnologia da Unicamp, sendo avaliado os danos em células de sua hemolinfa.

O presente projeto está atrelado ao Projeto BioColour, consórcio recentemente aprovado pela *Strategic Research Council* na *Academy of Finland*, o qual realiza estudos de novos corantes naturais. No Brasil, o projeto é liderado pela Prof.ª Dr.ª Gisela de Aragão Umbuzeiro, responsável pelo Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG) onde se realizam testes de toxicidade de corantes.

2 Objetivo

Avaliar se o corante natural emodin é genotóxico *in vivo* utilizando o anfípode marinho *Parhyale hawaiensis.*

3 Materiais e métodos

3.1 Corante e reagentes utilizados

O emodin, cas number 518-82-1 (1,3,8-Trihydroxy-6-methyl-9,10-anthracenedione), utilizado nesse estudo teve sua pureza determinada em 98,34% e uma amostra foi encaminhada ao Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade pela pesquisadora Dr.ª Riikka Raisanen da Universidade de Helsinki, Finlândia, participante do Projeto BioColour.

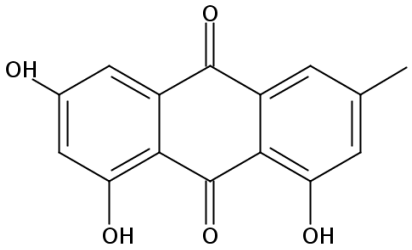


Figura 1 – Estrutura molecular do emodin

Para a realização dos ensaios, foram utilizados os reagentes etilmetanosulfonato (EMS, Sigma-Aldrich, CAS 62-50-0) como controle positivo, e dimetilsufóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, CAS 67-68-5) como solvente. Para o ensaio cometa foram utilizados como reagentes a agarose Normal Melting Point (NMP, Sigma A9539), agarose Low Melting Point (LMP, Sigma A9539), tampão fostato salino pH 7,4 (NaCl, KCl, Na_2HPO_4. 12 H_2O, KH_2PO_4, água destilada), solução de lise estoque (NaCl, EDTA, Tris, NaOH), EDTA estoque (EDTA, água destilada), NaOH estoque (NaOH, água destilada), solução de neutralização Tris pH 7,5 (Tris, água destilada), solução de lise final (Triton X-100, DMSO, solução de lise estoque), tampão de eletroforese (EDTA estoque, NaOH estoque, água destilada).

3.2 Cultivo de organismos

Os organismos marinhos *Parhyale hawaiensis* (Figura 2) são cultivados desde 2010 no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG), de acordo com as condições indicadas na Tabela 1.

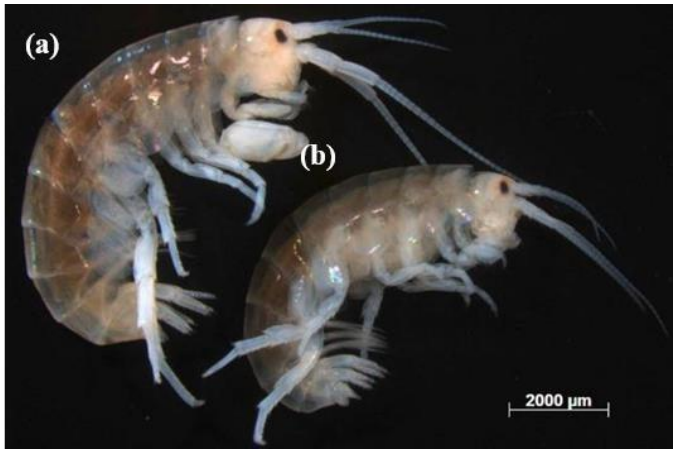


Figura 2 - *Parhyale hawaiensis*, macho (a) e fêmea (b), cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (Fonte: Instituto de Biologia da UNICAMP).

Tabela 1 - Condições de cultivo de *Parhyale hawaiensis.*

Parâmetros	**Condições**
Recipientes	Recipientes plásticos de 5,0 L com cerca de 2,5 L de água reconstituída
Água de cultivo	Água reconstituída em salinidade 30, utilizando sal marinho Red Sea Salt®
Substrato	Atlantic Crushed Coral #8 Nature's Ocean®
Aeração	Constante com bombas para aquário, mangueiras plásticas e pedras porosas
Local do cultivo	Câmara incubadora Marconi®
Temperatura	24 ± 2 ºC
Fotoperíodo	12 horas de luz e 12 horas de escuro
Manutenção	Troca parcial de água de cultivo 2 vezes por semana Troca total de água do cultivo e contagem dos organismos 1 vez por mês
Alimentação	5 vezes por semana com ração para peixe herbívoro em pastilha JBL®
Avaliação da cultura	Testes de sensibilidade realizados mensalmente, utilizando como substância de referência sulfato de zinco

3.3 Teste de toxicidade aguda com emodin

O ensaio cometa deve ser realizado em concentrações subletais para garantir que os organismos estejam vivos no momento da coleta da hemolinfa. Para definir as

concentrações a serem utilizadas no teste de genotoxicidade, foi realizado um ensaio preliminar com *Parhyale hawaiensis*, baseado em Artal et al., (2018). A solução estoque de emodin estava na concentração de 3 g/L solubilizado em DMSO 100%. De acordo com a OECD, o limite máximo de DMSO que pode ser utilizado é de 0,01%, sendo um volume que não implica em alterações nos resultados devido ao seu uso. Desta forma, o emodin foi testado na concentração de 0,3 mg/L, que corresponde a 0,01% da solução estoque. Neonatos (≤ 7 dias de vida) e organismos adultos (8 meses de vida) foram expostos a 0,3 mg/L de emodin solubilizado em DMSO e diluído em água salina. Foram também realizados controles negativos com água salina e com DMSO 0,01%. O ensaio com neonatos foi realizado em uma microplaca de 96 poços, sendo que para cada concentração foram utilizados 32 organismos, 1 organismo por poço, contendo 200 µL da amostra. O teste com organismos adultos foi realizado em um microplaca de 12 poços, sendo 12 organismos por concentração e 4 mL de solução por poço. As condições de exposição foram de 12 h luz / 12 h escuro, temperatura de 24 ± 2 ºC, durante 96 h em uma câmara incubadora Eletrolab®. Ao final do teste, com auxílio de um estéreomicroscópio (Zeiss®, Stemi, 2000-C), os organismos mortos foram contabilizados e os parâmetros físico-químicos (salinidade, pH e oxigênio dissolvido) analisados. O teste é considerado válido caso a mortalidade no controle negativo seja inferior a 10%. Paralelamente, foram realizados testes de sensibilidade durante o segundo semestre de 2020, utilizando zinco como substância de referência. Após 96 horas, verificou-se a mortalidade (%) dos organismos e, utilizando o software Jspear pelo método de Trimmed Spearman-Karber.

3.4 Avaliação da genotoxicidade

3.4.1 **Exposição dos organismos**

Foram utilizados organismos de 8 meses de idade expostos *in vivo* às concentrações de 0,03 mg/L, 0,1 mg/L e 0,3 mg/L do corante natural emodin, além do controle negativo (água salina), DMSO e controle positivo (EMS), que em ensaios preliminares demonstrou-se genotóxico na concentração utilizada. As concentrações foram definidas de acordo com os resultados obtidos no teste de toxicidade aguda (item 3.3). Para cada concentração, foram expostos 12 organismos, sendo 4 machos

e 4 fêmeas utilizados para o ensaio cometa, e 2 machos e 2 fêmeas usados para citotoxicidade. Parâmetros físico-químicos (salinidade, pH e oxigênio dissolvido) foram medidos no início e no fim da exposição dos organismos (Anexo B).

3.4.2 **Citotoxicidade**

Foi realizado um ensaio de citotoxicidade para verificar se as células dos organismos estavam vivas após exposição às diferentes concentrações e controles, de forma a garantir que o dano observado foi causado pelo corante, e não por morte celular. A citotoxicidade foi feita com diluição da hemolinfa em água salina e azul de trypan (0,4%) para posterior leitura em uma câmara de Neubauer. Solução estoque de azul de trypan foi diluída em água deionizada para posterior filtração e armazenamento em geladeira. Células não viáveis ficam coradas de azul enquanto que células viáveis não coram. A citotoxicidade foi calculada como a porcentagem de células viáveis em relação ao total de células.

3.4.3 **Ensaio Cometa**

O ensaio cometa foi realizado com células de hemolinfa de *Parhyale hawaiensis*, sendo o protocolo adaptado de Lacaze et al., (2010).

Lâminas novas foram mergulhadas em um béquer contendo agarose dissolvida a 60ºC em banho maria, de modo a formar uma camada fina na parte frontal. As lâminas foram deixadas para secar overnight, à temperatura ambiente, em posição horizontal em uma bandeja.

No dia seguinte, foram coletadas as amostras de hemolinfa da *Parhyale hawaiensis* ao inserir um capilar no 2º ou 3º seguimento do organismo (Figura 3). Com o auxílio de uma bomba de ar, a amostra foi transferida para um eppendorf contendo 20 µL de água salina, salinidade 30 e, em seguida, 20 µL de agarose Low Melting Point (LMP) 1% foram adicionados ao mesmo. Uma alíquota de 20 µL da amostra foi adicionadas à uma lâmina, formando um gel, sendo cada um recoberto com uma lamínula. As lâminas preparadas foram deixadas por 20 minutos em uma geladeira a aproximadamente 4ºC. Decorrido o tempo, removeu-se cautelosamente as lamínulas. As lâminas preparadas foram postas em uma cubeta e recobertas com a solução de

lise final e mantidas na geladeira por 1 h. Após esta etapa, as lâminas foram retiradas da cubeta e lavadas com água salina gelada para serem adicionadas à cuba na etapa de desenrolamento do DNA. Estas foram postas com o lado fosco virado para o eletrodo vermelho e recobertas com a solução de eletroforese gelada, mantendo-se em repouso por 5 minutos. Em seguida, nas condições de 20V e 300mA, iniciou-se a corrida por 20 minutos. Completado o período, as lâminas foram removidas da cuba e lavadas com solução de neutralização gelada, deixando escorrer por 5 minutos. O procedimento foi repetido mais duas vezes. Na etapa de fixação, as lâminas foram cobertas com etanol 100% durante 15 minutos e, posteriormente, foram deixadas à temperatura ambiente por 2 h para secarem.

No momento da leitura das lâminas, 20 µL da solução de brometo de etídio 4% (brometo de etídio 20% dissolvido em água deionizada) foram adicionados em cada gel e recobertos com uma lamínula. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência. O software utilizado para análise da intensidade da cauda (%) foi o Comet Score 2.0, sendo contabilizadas 100 células para cada concentração, correspondente a duas lâminas de organismos machos e duas lâminas de fêmeas. Os dados foram analisados estatisticamente no software R, versão 3.6.2, sendo realizado primeiramente um teste de normalidade, Shapiro-Wilk, com significância $p<0,01$, e, em seguida, foi feito o teste de Kruskal-Wallis, para verificar se as amostras são diferentes do controle, com significância $p<0,05$.

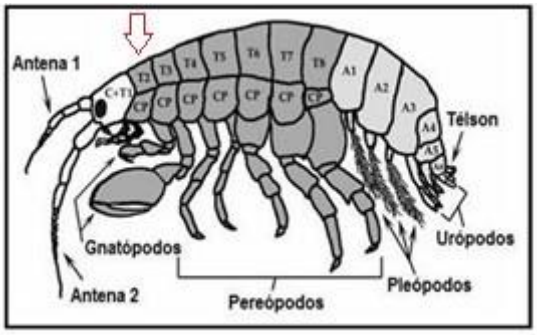


Figura 3 - Esquema de um organismo da espécie *Parhyale hawaiensis* (fonte: REHM et al., 2009). A seta vermelha indica o local onde o capilar foi inserido para retirada da hemolinfa.

4 Resultados e discussão

4.1 Teste de toxicidade aguda com emodin

Organismos adultos e neonatos não apresentaram mortalidade para os controles com água salina e DMSO. Quanto ao emodin, houve uma mortalidade em ambos, o que corresponde a 8,3% dos adultos e 3,1% das neonatos, porém essa mortalidade é inferior a 10%, desta forma o corante foi considerado não tóxico nessa concentração. Uma vez que o teste foi considerado válido, a concentração de 0,3 mg/L foi adotada como máxima para avaliação da genotoxicidade.

4.2 Genotoxicidade do emodin

O Ensaio Cometa foi realizado com organismos de 8 meses de idade expostos às concentrações de 0,3 mg/L, 0,1 mg/L e 0,03 mg/L do corante natural emodin, além do controle negativo (água salina), DMSO 0,01% e controle positivo (EMS). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 2 e seu gráfico na Figura 4.

Tabela 2 – Média de danos no DNA e desvio padrão avaliados pelo ensaio cometa em células de hemolinfa de *P. hawaiensis* após exposição ao emodin e controles negativos e positivos e citotoxicidade.

Exposição	Média Dano (%)	Desvio Padrão (%)	Citotoxicidade (%)[a]
Controle negativo	5,4	6,3	93,8
DMSO 0,01%[b]	7,5	11,2	85,4
0,03 mg/L	4,4	7,6	99,6
0,1 mg/L	9,9	15,0	99,3
0,3 mg/L	34,2	37,1	97,7
EMS[c]	38,9	38,0	91,4

a) Citotoxicidade – Células viáveis em relação ao total de células.
b) Concentração máxima de 0,01%
c) Concentração de 1,206 mg/L

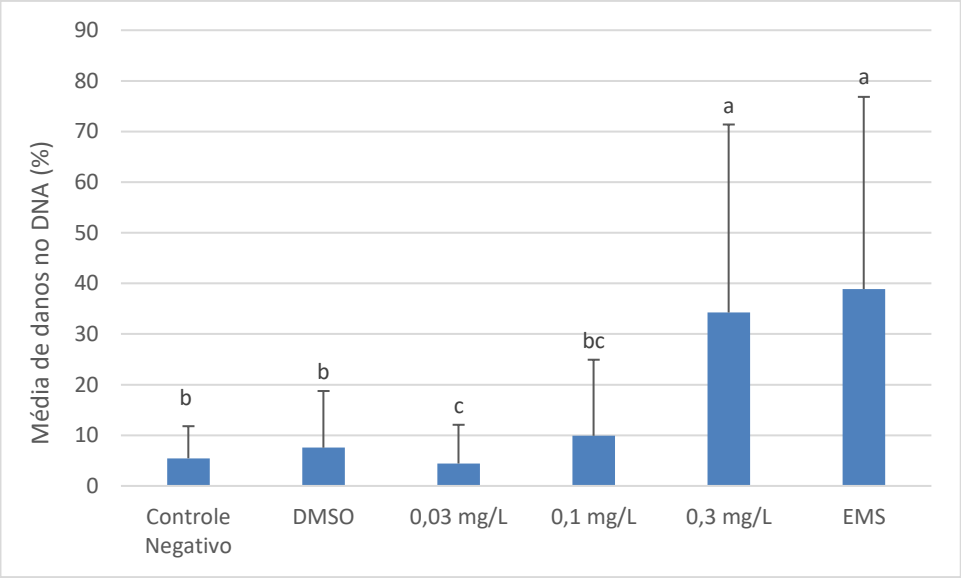


Figura 4 – Média de danos no DNA de *P. hawaiensis* para cada concentração de exposição. (a), (b) e (c): amostras estatisticamente diferentes (n=100) no teste de Kruskal Wallis.

As células apresentaram-se viáveis em todas as exposições realizadas, e o controle positivo respondeu adequadamente, sendo estatisticamente diferente do controle negativo. Desta forma, o ensaio pode ser considerado válido. Ao realizar o teste de Shapiro-Wilk, o resultado indicou não normalidade da curva ($p<2{,}2.10^{-16}$). Assim, realizou-se o teste não paramétrico de Kruskal Wallis, o qual resultou em diferença significativa entre as concentrações ($p< 3{,}3.10^{-13}$).

Observou-se que houve um aumento significativo na porcentagem de dano na concentração de 0,3 mg/L de emodin em relação ao controle negativo e ao controle de solvente (DMSO). Para o controle positivo não houve diferença significativa, indicando genotoxicidade. A concentração de 0,03 mg/L apresentou uma menor porcentagem de danos que o controle negativo e DMSO. Os dados demonstraram que o emodin é capaz de induzir danos nas células de hemolinfa do organismo teste após 96h de exposição, confirmando sua genotoxicidade *in vivo*. Os dados brutos dos danos nas 100 células de cada concentração encontram-se no Anexo A.

Uma vez que resultados sugerem que sua estrutura planar pode ser responsável sua genotoxicidade, de acordo com os dados da literatura do teste de Ames, os próximos passos desta pesquisa será modificar a estrutura da molécula adicionando radicais. Espera-se que essa nova molécula tenha propriedades

adequadas para colorir tecidos e perca sua capacidade genotóxica, a qual será avaliada usando o teste de Ames e o ensaio cometa com *Parhyale hawaiensis*.

5 Conclusão

Concluiu-se que o emodin é capaz de induzir danos nas células de hemolinfa de *Parhyale hawaiensis* após 96h de exposição, confirmando sua genotoxicidade *in vivo*.

6 Referências

ARORA, S. Textile Dyes: It's Impact on Environment and its Treatment. Journal of Bioremediation & Biodegradation, v. 05, n. 03, p. 6199, 2014.

ARTAL, M. C. et al. Development of an acute toxicity test with the tropical marine amphipod Parhyale hawaiensis. Ecotoxicology, v. 27, n. 2, p. 103–108, 2018.

BROWN, J. P.; BROWN, R. J. Mutagenesis by 9,10-anthraquinone derivatives and related compounds in Salmonella typhimurium. Mutagenic Research/Genetic Toxicology, v. 40, n. 3, p. 203–224, 1976.

BROWN, J. P.; DIETRICH, P. S. Mutagenicity of anthraquinone and benzanthrone derivatives in the Salmonella/Microsome test: activation of anthraquinone glycosides by enzymic extracts of rat cecal bacteria v. 66, p. 9–24, 1979.

CHEQUER, F. M. D. et al. The azo dye Disperse Red 13 and its oxidation and reduction products showed mutagenic potential. Toxicology in Vitro, v. 29, n. 7, p. 1906–1915, 1 out. 2015.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. Molecular Biotechnology, v. 26, p. 249–261, 2004.

DENG, M. et al. Imperatorin: A review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics. European Journal of Pharmacology, v. 879, n. May, p. 1207–1218, 2020.

DUVAL, J. et al. Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. Industrial Crops and Products, v. 94, p. 812–833, 30 dez. 2016.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, v. 681, n. 1, p. 80–92, 1 jan. 2009.

HAN, J. et al. Gamma rays induce DNA damage and oxidative stress associated with impaired growth and reproduction in the copepod Tigriopus japonicus. Aquatic Toxicology, v. 152, p. 264–272, 1 jul. 2014.

LACAZE, E. et al. Genotoxicity assessment in the amphipod Gammarus fossarum by use of the alkaline Comet assay. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 700, n. 1–2, p. 32–38, 19 jul. 2010.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, v. 544, n. 1, p. 43–64, 1 set. 2003.

NESSLANY, F. et al. Aloe-emodin-induced DNA fragmentation in the mouse in vivo comet assay. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 678, n. 1, p. 13–19, 2009.

OSMAN, A. G. M. Genotoxicity Tests and Their Contributions in Aquatic Environmental Research. Journal of Environmental Protection, v. 05, n. 14, p. 1391–1399, 2014.

STAMATAKI, E.; PAVLOPOULOS, A. Non-insect crustacean models in developmental genetics including an encomium to Parhyale hawaiensis. Current Opinion in Genetics & Development, v. 39, p. 149–156, 1 ago. 2016.

TICHONOVAS, M. et al. Degradation of various textile dyes as wastewater pollutants under dielectric barrier discharge plasma treatment. Chemical Engineering Journal, v. 229, p. 9–19, 2013.

VACCHI, F. I. et al. Quantifying the contribution of dyes to the mutagenicity of waters under the influence of textile activities. Science of The Total Environment, v. 601–602, p. 230–236, 1 dez. 2017.

VACCHI, F. I. et al. Parhyale hawaiensis as a promising alternative organism for monitoring acute toxicity of sediments under the influence of submarine outfalls. Marine Pollution Bulletin, v. 149, p. 110658, 1 dez. 2019.

WESTENDORF, J. et al. Genotoxicity of naturally occurring hydroxyanthraquinones. Mutation Research/Genetic Toxicology, v. 240, n. 1, p. 1–12, 1990.

ANEXO A – Dados brutos de danos no DNA (%)

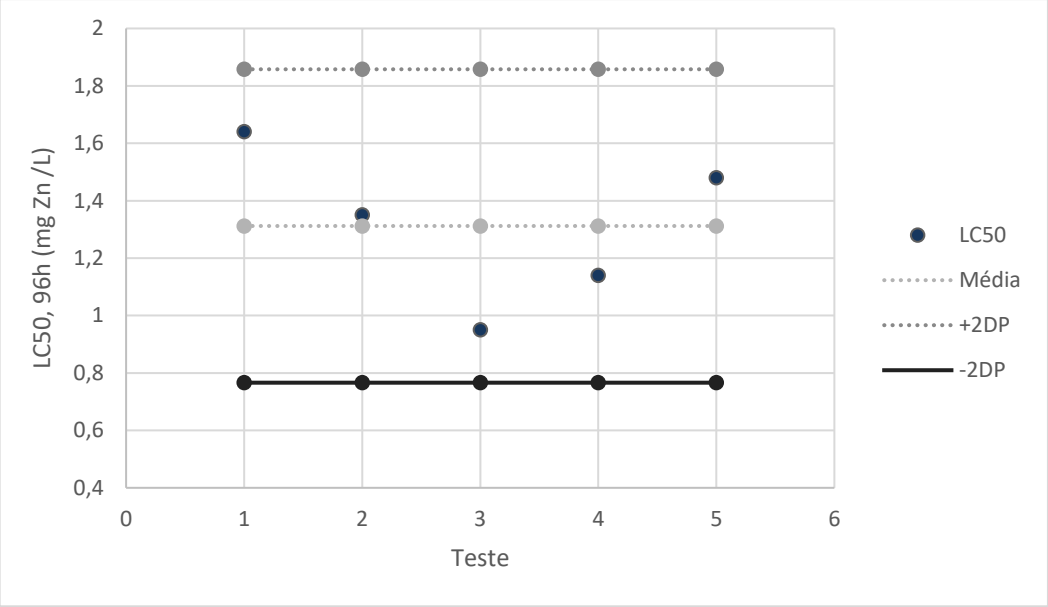
Controle negativo	0,00	0,67	0,29	17,69	0,04	30,53	0,57	1,00	0,00	0,45	3,68	9,50	11,41	13,21	3,22	14,89	3,78	11,58	0,92	0,01
	3,32	0,53	0,31	0,48	4,35	7,45	5,55	3,44	8,95	5,15	0,14	1,10	0,93	13,89	19,70	2,92	3,04	0,16	4,66	0,05
	13,92	12,18	1,04	0,97	0,00	1,37	0,22	11,17	0,00	6,52	0,08	0,10	1,79	19,85	0,00	17,11	9,59	0,91	8,33	5,30
	8,93	4,22	0,07	0,00	1,27	16,62	4,07	4,68	6,25	3,55	5,40	4,43	7,19	2,54	5,37	20,46	0,18	0,69	0,00	1,03
	8,25	0,00	9,30	12,65	0,06	0,00	3,07	0,13	11,08	13,36	0,13	3,54	20,83	7,82	10,41	7,56	0,30	18,65	0,27	1,05
DMSO 0,01 %	15,99	0,62	5,41	1,36	6,25	0,20	21,58	6,68	0,01	4,34	10,22	0,00	27,74	0,33	0,00	0,44	1,10	16,23	17,52	0,13
	17,02	6,74	0,00	0,61	27,36	9,31	7,38	2,86	0,03	0,46	1,01	12,91	0,02	5,66	0,03	0,55	35,45	7,80	0,65	8,81
	0,41	1,39	0,01	6,41	0,10	42,82	2,97	0,00	1,19	27,53	74,70	0,00	0,30	15,64	15,99	0,00	6,65	0,83	0,09	16,48
	0,96	32,83	0,01	0,00	0,05	9,17	0,59	0,00	2,41	10,20	17,43	2,58	2,07	15,20	0,57	4,72	13,82	0,11	1,13	6,93
	19,90	10,96	0,05	6,12	9,89	0,00	23,64	0,00	7,09	2,56	9,29	15,90	6,33	0,01	0,00	2,99	0,04	0,04	11,98	13,23
Emodin 0,03 mg/L	0,01	6,49	9,94	4,15	11,59	0,11	1,39	0,00	4,52	3,05	0,07	0,02	4,20	0,00	13,33	7,38	0,01	14,11	0,23	3,14
	1,70	0,00	2,43	4,91	0,35	4,32	0,00	0,02	0,00	0,16	13,42	0,01	3,94	0,06	0,00	12,12	12,03	0,00	8,52	0,04
	7,29	0,00	3,00	0,06	0,14	14,03	0,00	2,47	0,03	6,44	15,23	7,00	0,00	0,27	1,57	13,26	0,01	2,54	0,00	0,03
	12,27	0,00	9,05	0,00	0,00	1,04	0,00	0,01	1,17	0,09	4,76	12,68	0,02	0,10	10,30	0,00	0,87	0,02	0,00	0,00
	62,80	10,13	8,43	0,00	8,68	14,33	3,38	11,78	0,33	3,46	0,00	0,00	6,24	0,01	12,24	4,06	2,90	1,89	0,14	18,29
Emodin 0,1 mg/L	7,19	2,90	34,14	12,60	0,01	18,03	13,69	34,60	7,10	0,18	0,08	27,05	0,00	13,26	27,85	36,22	48,94	0,11	43,60	19,08
	4,53	0,05	1,74	0,01	0,15	3,30	0,93	8,13	10,14	0,05	1,70	0,15	24,99	83,36	9,57	0,00	3,58	0,00	0,00	0,41

	0,09	11,37	0,35	9,68	41,21	3,39	0,32	0,39	0,00	49,96	8,41	0,00	0,30	35,22	0,00	11,45	14,94	0,40	21,68	11,29
	3,08	0,01	0,00	11,97	0,02	0,11	6,59	0,00	0,43	0,00	2,28	6,25	32,41	9,18	24,44	9,99	9,42	0,00	0,01	0,01
	0,26	25,01	0,00	0,20	42,49	0,04	4,12	0,46	0,14	0,00	9,70	0,00	21,56	0,00	0,63	0,00	42,35	5,55	0,00	1,10
Emodin 0,3 mg/L	0,00	0,04	3,45	1,66	0,05	65,58	93,66	0,00	1,81	10,43	0,00	71,11	0,14	16,71	80,99	14,64	1,83	0,05	89,40	0,08
	10,66	30,96	73,35	81,35	74,95	93,88	86,70	0,00	93,43	86,96	0,09	25,30	9,60	0,01	84,49	90,04	92,25	90,83	0,00	84,73
	28,47	0,02	4,30	87,43	91,71	8,32	9,99	0,00	23,84	81,43	64,10	4,94	0,09	22,44	25,58	77,15	87,74	98,39	89,94	0,01
	0,02	0,00	7,02	40,37	6,58	7,69	94,70	1,25	0,00	6,10	0,00	8,36	91,94	0,18	8,13	72,54	0,01	81,06	79,51	0,38
	71,26	0,00	65,17	28,37	37,31	6,31	0,04	74,01	0,01	0,07	12,72	0,87	9,66	0,00	41,76	32,42	6,29	87,41	14,17	64,56
EMS	0,00	27,77	94,80	3,03	5,19	0,03	49,35	37,58	86,89	92,58	60,04	0,00	0,04	0,00	49,18	88,39	2,40	0,18	30,69	93,94
	26,04	4,01	0,00	85,14	89,17	95,24	6,91	72,70	0,03	5,23	0,08	1,86	1,83	0,00	95,66	3,18	90,71	77,46	0,18	57,76
	0,00	3,21	1,07	0,04	87,50	94,41	92,97	58,25	1,31	28,22	3,23	0,57	18,02	1,93	7,20	0,01	0,01	42,93	0,06	25,64
	70,63	0,00	10,85	95,17	0,68	3,55	94,59	92,85	86,92	83,81	4,84	91,34	78,97	5,25	95,13	90,62	33,84	90,66	37,08	0,00
	38,37	1,90	65,48	35,77	56,74	0,27	53,93	88,97	48,16	83,67	21,83	61,90	92,02	0,18	92,96	9,56	19,82	1,75	55,75	90,26

ANEXO B – Parâmetros iniciais e finais das exposições para a realização do ensaio agudo

		Inicial	Final
Água salina	**Salinidade**	30,61	30,47
	pH	8,59	8,01
	Oxigênio Dissolvido	6,12	5,83
DMSO	**Salinidade**	30,13	29,57
	pH	7,99	8,05
	Oxigênio Dissolvido	6,28	5,39
Emodin	**Salinidade**	30,75	29,92
	pH	8,02	8,00
	Oxigênio Dissolvido	5,58	5,21

ANEXO C – Parâmetros das exposições para a realização do ensaio cometa.

		Inicial	Final
Água salina	**Salinidade**	28,87	28,69
	pH	8,10	8,01
	Oxigênio dissolvido	6,01	6,27
DMSO	**Salinidade**	29,81	29,60
	pH	8,17	8,07
	Oxigênio dissolvido	5,95	5,88
Emodin 0,03 mg/L	**Salinidade**	29,89	29,23
	pH	-	8,07
	Oxigênio dissolvido	-	5,48
Emodin 0,1 mg/L	**Salinidade**	30,47	28,62
	pH	8,20	8,09
	Oxigênio dissolvido	5,72	5,95
Emodin 0,3 mg/L	**Salinidade**	28,64	28,07
	pH	8,22	8,09
	Oxigênio dissolvido	5,53	6,08
EMS	**Salinidade**	29,92	29,31
	pH	8,22	7,95
	Oxigênio dissolvido	5,73	5,49

ANEXO D – Carta Controle