



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Tecnologia

**Gabriel Rampazzo Magalhães**

**AVALIAÇÃO DA ECO/GENOTOXICIDADE DE UM CORANTE NATURAL  
MODIFICADO PARA PROCESSOS SUSTENTÁVEIS**

Limeira  
2023

**GABRIEL RAMPAZZO MAGALHÃES**

**AVALIAÇÃO DA ECO/GENOTOXICIDADE DE UM CORANTE NATURAL  
MODIFICADO PARA PROCESSOS SUSTENTÁVEIS**

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

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gisela de Aragão Umbuzeiro**

Este trabalho corresponde à versão final da dissertação defendida por Gabriel Rampazzo Magalhães e orientada pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gisela de Aragão Umbuzeiro.

LIMEIRA

2023

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Tecnologia  
Felipe de Souza Bueno - CRB 8/8577

M27a Magalhães, Gabriel Rampazzo, 1995-  
Avaliação da eco/genotoxicidade de um corante natural modificado para processos sustentáveis / Gabriel Rampazzo Magalhães. – Limeira, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Gisela de Aragão Umbuzeiro.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Tecnologia.

1. Emodina. 2. Antraquinonas. 3. Ensaio cometa. 4. Testes de mutagenicidade. 5. Organismos aquáticos. I. Umbuzeiro, Gisela de Aragão, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Tecnologia. III. Título.

Informações Complementares

**Título em outro idioma:** Evaluation of the eco/genotoxicity of a natural dye modified for sustainable processes

**Palavras-chave em inglês:**

Emodin

Antraquinonas

Comet assay

Mutagenicity testing

Aquatic organisms

**Área de concentração:** Ambiente

**Titulação:** Mestre em Tecnologia

**Banca examinadora:**

Gisela de Aragão Umbuzeiro [Orientador]

Alyson Rogério Ribeiro

Francine Inforçato Vacchi

**Data de defesa:** 26-10-2023

**Programa de Pós-Graduação:** Tecnologia

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4993-3410>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0542148010993231>

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Abaixo se apresentam os membros da comissão julgadora da sessão pública de defesa de dissertação para o Título de Mestre em Tecnologia na área de Ambiente, a que se submeteu o aluno Gabriel Rampazzo Magalhães, em 26 de outubro de 2023 na Faculdade de Tecnologia – FT/UNICAMP, em Limeira/SP.

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gisela de Aragão Umbuzeiro**

Presidente da Comissão Julgadora

**Prof. Dr. Alyson Rogério Ribeiro**

Universidade Federal de Minas Gerais

**Dr.<sup>a</sup> Francine Inforçato Vacchi**

Pesquisadora

Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Tecnologia.

## **Agradecimentos**

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

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 Amanda dos Santos e Marina Tenório Botelho, por me auxiliarem e contribuírem com meu crescimento.

Às agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa (processo nº 2021/06369-2) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Ao projeto BioColour (<https://biocolour.fi>) financiado pelo Conselho de Pesquisa Estratégica da Academia da Finlândia (concessões #327178, #327213 e #352460). As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do autor e não necessariamente refletem a visão da FAPESP, CAPES e CNPq.

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

## RESUMO

Os processos de tingimento tradicionais consomem grandes volumes de água e energia, não sendo ambientalmente sustentáveis. Desta forma, processos de tingimento em que não há uso de água (*waterless*) vêm sendo desenvolvidos, como o dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) e o plasma atmosférico. O emodin é uma antraquinona de origem natural que, entre seus usos, é aplicado como corante na indústria têxtil. O emodin apresentou resultados promissores para o SC-CO<sub>2</sub>, mas para ser utilizado no plasma atmosférico, é necessário ter um grupo acrilóil para ser aderido aos tecidos. Esse corante demonstrou ser mutagênico, agindo por intercalação no DNA devido à planaridade de sua molécula. Foram feitas modificações químicas no emodin por meio da adição de um grupo acrilóil, gerando dois novos compostos (Em-DR1 e Em-DR2). Essa alteração teve como objetivo gerar moléculas não mutagênicas. Os compostos derivatizados foram testados quanto à mutagenicidade e genotoxicidade utilizando um teste *in vitro* com bactérias (teste de Ames) e *in vivo* (ensaio cometa e teste de micronúcleo em hemócitos de *Parhyale hawaiiensis*). Os compostos foram gerados com sucesso, entretanto, apresentaram mutagenicidade no teste com bactérias, similarmente ao observado para o emodin. Os dois produtos, bem como o emodin, aumentaram a frequência de micronúcleos na hemolinfa de *P. hawaiiensis*, porém, não foram genotóxicos quando avaliados no teste do cometa. Embora o Em-DR1 e Em-DR2 sejam uma alternativa interessante para serem utilizados em tingimento por plasma atmosférico, não parecem ser uma alternativa do ponto de vista genotóxico e mutagênico. Esse trabalho mostra a importância de avaliar novos corantes tanto de origem natural como modificados quimicamente quanto a suas propriedades mutagênicas antes do seu oferecimento para o mercado.

Palavra-chave: emodin, antraquinona, ensaio cometa, mutagenicidade, *Parhyale hawaiiensis*.

## ABSTRACT

Traditional dyeing processes consume large volumes of water and energy, not being environmentally sustainable, therefore, waterless dyeing processes have been developed, such as supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) and atmospheric plasma. Emodin is an anthraquinone of natural origin that, among its uses, is applied as a dye in the textile industry. Emodin showed promising results for SC-CO<sub>2</sub>, but to be used in atmospheric plasma, it is necessary to have an acryloyl group to be adhered to tissues. This dye proved to be mutagenic, acting by intercalation in the DNA due to the planarity of its molecule. Chemical modifications were made to emodin through the addition of an acryloyl group, generating two new compounds (Em-DR1 and Em-DR2). This alteration aimed to generate non-mutagenic molecules. The derivatized compounds were tested for mutagenicity and genotoxicity using an *in vitro* bacterial test (Ames test) and *in vivo* test (comet assay and micronucleus test on *Parhyale hawaiiensis* hemocytes). The compounds were successfully generated, however, they showed mutagenicity in the test with bacteria, similarly to that observed for emodin. The two products, as well as emodin, increased the frequency of micronuclei in the hemolymph of *P. hawaiiensis*, however, they were not genotoxic when evaluated in the comet test. Even though Em-DR1 and Em-DR2 are an interesting alternative to be used in atmospheric plasma dyeing, they do not seem to be an alternative from the genotoxic and mutagenic point of view. This work shows the importance of evaluating new dyes, both natural and chemically modified, for their mutagenic properties before being offered to the market.

Keyword: emodin, anthraquinone, comet assay, mutagenicity, *Parhyale hawaiiensis*.

## Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura química do emodin. ....	15
Figura 2 - Esquema representativo da síntese das derivatizações do emodin. ....	16
Figura 3 - Estruturas do Em-DR1, à esquerda, e Em-DR2, à direita.....	22
Figura 4 - Média da porcentagem de DNA na cauda nas células da hemolinfa de <i>P. hawaiiensis</i> após exposição <i>in vivo</i> ao emodin e seus produtos derivatizados (Em-DR1 e Em-DR2) por 96 horas. As barras de erro representam o erro padrão. (*): estatisticamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ). ....	26
Figura 5 - Frequência de micronúcleos (%) em 500 células da hemolinfa de <i>P. hawaiiensis</i> para cada exposição. A barra de erro representa o erro padrão. (*): estatisticamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ). (n): número de organismos analisados. ....	28
Figura 6 - Células da hemolinfa de <i>Palyale hawaiiensis</i> avaliadas no ensaio de micronúcleo. À esquerda, célula com micronúcleo, indicado pela seta preta. À direita, célula sem micronúcleo. Autoria: Marina Tenório Botelho.....	29
Figura 7 - Média da porcentagem de DNA na cauda nas células da hemolinfa de <i>P. hawaiiensis</i> de organismos machos e fêmeas após exposição <i>in vivo</i> ao emodin e seus produtos derivatizados (Em-DR1 e Em-DR2) por 96 horas. As barras de erro representam o erro padrão. ....	37
Figura 8 - Frequência de micronúcleos (%) em 500 células da hemolinfa de <i>P. hawaiiensis</i> de organismos machos e fêmeas para cada exposição. A barra de erro representa o erro padrão. (n): número de organismos analisados. ....	42

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Dados de mutagenicidade do emodin e seus produtos derivatizados (Em-DR1 e Em-DR2) representado pela média $\pm$ desvio padrão (DP) do número de revertentes, para a linhagem TA 1537 de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica usando 10% de S9.....	24
Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos do ensaio cometa anteriormente e após exposição de 96h de <i>P. hawaiiensis</i> a emodin, Em-DR1 e Em-DR2.....	38
Tabela 3 - Viabilidade das células de <i>P. hawaiiensis</i> no ensaio cometa após exposição de 96h a emodin, Em-DR1 e Em-DR2.....	39
Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos do primeiro ensaio de micronúcleo anteriormente e após exposição de 96h de <i>P. hawaiiensis</i> a emodin, Em-DR1 e Em-DR2.....	40
Tabela 5 - Parâmetros físico-químicos do segundo ensaio de micronúcleo anteriormente e após exposição de 96h de <i>P. hawaiiensis</i> a emodin, Em-DR1 e Em-DR2.....	41

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	12
2.	OBJETIVOS .....	15
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1.	Derivatização do emodin .....	15
3.2.	Ensaio de mutagenicidade <i>in vitro</i> com bactérias.....	17
3.3.	Teste de genotoxicidade e mutagenicidade <i>in vivo</i> com <i>Parhyale hawaiiensis</i> 18	
3.3.1.	Ensaio Cometa.....	18
3.3.2.	Teste de micronúcleo.....	20
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
4.1.	Derivatização do emodin .....	22
4.2.	Ensaio de mutagenicidade <i>in vitro</i> com bactérias.....	22
4.3.	Ensaio de genotoxicidade e mutagenicidade <i>in vivo</i> com <i>Parhyale hawaiiensis</i> 25	
4.3.1.	Ensaio Cometa.....	25
4.3.2.	Teste de micronúcleo.....	27
5.	CONCLUSÃO.....	30
	REFERÊNCIAS .....	31
	ANEXO I - RESULTADOS DO ENSAIO COMETA PARA ORGANISMOS MACHOS E FÊMEAS DE <i>P. HAWAIENSIS</i> .....	37
	ANEXO II - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO ENSAIO COMETA .....	38
	ANEXO III - VIABILIDADE CELULAR.....	39
	ANEXO IV - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO PRIMEIRO ENSAIO DE MICRONÚCLEO.....	40
	ANEXO V - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO SEGUNDO ENSAIO DE MICRONÚCLEO.....	41

ANEXO VI – RESULTADO DO ENSAIO DE MICRONÚCLEO PARA ORGANISMOS MACHOS E FÊMEAS DE <i>P. HAWAIENSIS</i> .....	42
---	----

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os processos tradicionais de tingimento consomem grandes quantidades de água e energia e, uma vez que podem introduzir uma variedade de poluentes em corpos d'água, não é um processo considerado ambientalmente sustentável (CARMEN; DANIEL, 2012). Corantes da classe das antraquinonas têm sido utilizados no processo de tingimento, mas possuem uma estrutura que as tornam de difícil degradação, tornando um problema ambiental (ALI, 2010; ROUTOULA; PATWARDHAN, 2020). Estima-se que 100.000 toneladas de corantes antraquinonas sejam produzidas por ano (IARC, 2012) com perda de 10% durante a aplicação no processo de tingimento (LAING, 1991).

Substâncias mutagênicas no meio ambiente podem levar à disfunção e morte celular de células somáticas em nível de indivíduos e, se atingirem células germinativas, as mutações podem causar efeitos adversos a nível populacional, como diminuição da reprodução e geração de descendentes com mutações (UMBUZEIRO; HERINGA; ZEIGER, 2017). Autores demonstraram que os corantes podem contribuir para a mutagenicidade detectada em corpos d'água utilizados para consumo humano (UMBUZEIRO et al., 2005) e preservação da vida aquática (VACCHI et al., 2017). Alternativas de tingimento sem água (*waterless*) têm sido desenvolvidas, como o dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) e o plasma atmosférico.

O processo SC-CO<sub>2</sub> utiliza como solvente o dióxido de carbono no estado supercrítico, devido ao seu alto poder de dissolução de compostos hidrofóbicos (ZHENG et al., 2017), como os corantes da classe das antraquinonas. O corante se dissolve sob pressão e temperatura elevadas e, após, adere-se à superfície do tecido. O dióxido de carbono no estado supercrítico é de custo relativamente baixo, reciclável, quimicamente inerte (HYATT, 1985) e promissor na indústria têxtil (MONTERO et al., 2000).

O plasma atmosférico é outra tecnologia de tingimento sem água. O tingimento ocorre por meio de energia eletromagnética à pressão e temperatura ambiente, e a absorção do corante nas fibras ocorre em tempo inferior a outros métodos de tingimento (ELABID et al., 2016). No entanto, o corante utilizado deve possuir um grupo vinil em sua estrutura química para a fixação no material. ZAIDY et al. (2019) desenvolveram corantes para serem utilizados neste tipo de processo, modificando moléculas de corantes dispersos mutagênicos. Os autores obtiveram corantes não mutagênicos que apresentaram alta eficiência no processo de tingimento por plasma atmosférico.

A indústria têxtil tem aumentado o interesse pelo uso de corantes naturais. Entre esses, estão os corantes extraídos dos fungos *Cortinarius sanguineus*, como o emodin. O emodin é uma antraquinona de origem natural que apresentou resultados promissores para o tingimento de diferentes fibras pelo processo SC-CO<sub>2</sub> (RÄISÄNEN; MONTERO; FREEMAN, 2021), incluindo fibras sintéticas de poliéster (HERRALA et al., 2022). Entre seus diferentes usos, o corante emodin tem sido aplicado em meio aquoso a fibras termoplásticas, como poliéster e nylon, produzindo tons amarelados (RÄISÄNEN; NOUSIAINEN; HYNNINEN, 2001; RÄISÄNEN, 2019). Porém, o emodin é mutagênico, o que dificulta sua aplicação comercial (WEHNER; THIEL; RAND, 1979; LIBERMAN et al., 1982). No teste de Ames, o emodin causa mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura para a linhagem de *Salmonella* TA1537 com ativação metabólica (S9), indicando que esta antraquinona age por intercalação no DNA (MASUDA; UENO, 1984; BÖSCH et al., 1987).

Para avaliação da mutagenicidade *in vitro* de compostos químicos, o teste de Ames (ensaio *Salmonella*) é mundialmente utilizado. São utilizadas linhagens de bactéria *Salmonella typhimurium* que foram previamente modificadas, não sendo capazes de produzir o aminoácido histidina, essencial para sua proliferação no meio de cultura. Ao entrar em contato com compostos mutagênicos, há reversão dos códons das bactérias, o que permite sintetizar o

aminoácido histidina, resultando em formação de colônias (AMES; LEE; DURSTON, 1973). O ensaio miniaturizado MPA (*Miniaturized Plate Assay*) permite a detecção de compostos mutagênicos *in vitro* utilizando uma menor quantidade de amostra e de materiais, reduzindo custos laboratoriais, e com alta eficiência (ZWARG et al., 2018). Ao atingirem ambientes marinhos, os corantes podem afetar sua biota (JAVAID; QAZI, 2019). Assim, para avaliar seu potencial mutagênico e genotóxico *in vivo*, é importante utilizar organismos representativos, como os anfípodes, que estão presentes em diferentes nichos tróficos (GLAZIER, 2009). *Parhyale hawaiiensis* é um anfípode marinho epibêntico com distribuição circuntropical que pode ser facilmente cultivado em laboratório e sua sensibilidade e representatividade têm permitido sua aplicação em testes ecotoxicológicos (ARTAL et al., 2018; SANTOS et al., 2022), mutagênicos e genotóxicos, incluindo o ensaio cometa e o teste de micronúcleo (BOTELHO et al., 2022).

O ensaio cometa é um dos principais testes para avaliar a genotoxicidade de substâncias em diferentes organismos, sendo um método relativamente simples e sensível para detectar danos no DNA. Durante uma eletroforese, os fragmentos da fita de DNA migram em meio alcalino e seu deslocamento é medido (OSTLING; JOHANSON, 1984; MØLLER et al., 2020). Esse teste pode ser utilizado na avaliação da genotoxicidade em células somáticas de invertebrados, incluindo anfípodes (WEBER et al., 2013; GAJSKI et al., 2019). O teste do micronúcleo detecta alterações cromossômicas causadas por contaminantes. Esse teste consiste em uma técnica relativamente rápida e simples em comparação com outras técnicas de avaliação de dano cromossômico, que é de natureza irreparável (BUTRIMAVIČIENĖ et al., 2018; OBIAKOR; OKONKWO, 2012). Este teste pode ser aplicado em diversas espécies, inclusive organismos aquáticos (SOMMER; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI, 2020).

O projeto BioColour ([www.biocolour.fi](http://www.biocolour.fi)) é um consórcio internacional em que estão sendo desenvolvidos corantes naturais e novas aplicações, em alternativa ao uso industrial de

corantes sintéticos. Participam diversos pesquisadores, sendo em sua maioria da Finlândia, além de participantes dos Estados Unidos e do Brasil, representado pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gisela de Aragão Umbuzeiro. A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gisela coordenou o projeto denominado ToxBioColour (Processo n° 2020/04628-8), que teve por objetivo caracterizar a toxicidade de corantes naturais promissores, utilizando organismos aquáticos em ensaios de toxicidade aguda e crônica e de genotoxicidade *in vivo*, onde este trabalho está inserido.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar a mutagenicidade e genotoxicidade do emodin e de seus produtos derivatizados.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O emodin (Figura 1) foi derivatizado pelo grupo do Dr. Harold Freeman, no Wilson College of Textiles, Estados Unidos, também participante do projeto BioColour. A parte relativa à avaliação da mutagenicidade dos produtos gerados foi feita pela equipe do Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG).

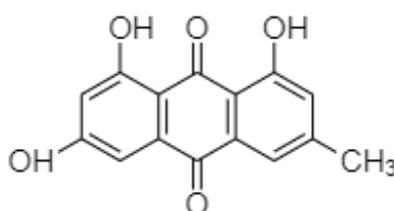


Figura 1 – Estrutura química do emodin.

### 3.1. Derivatização do emodin

Dois compostos derivatizados do emodin (Em-DR1 e Em-DR2) foram produzidos. Os grupos acrilóil foram considerados promissores na adição à molécula do emodin pois viabilizariam o seu uso em processos de tingimento que não utilizam água, como o plasma

atmosférico. Essa alteração também tinha o objetivo de remover o caráter planar do emodin, responsável pela sua atividade mutagênica. A reação foi feita com cloreto de etoxi-acrilóilo. Os grupos alvo foram incorporados nos grupos -OH do emodin (Figura 2) e os produtos obtidos foram analisados por métodos espectrométricos e tiveram suas estruturas confirmadas.

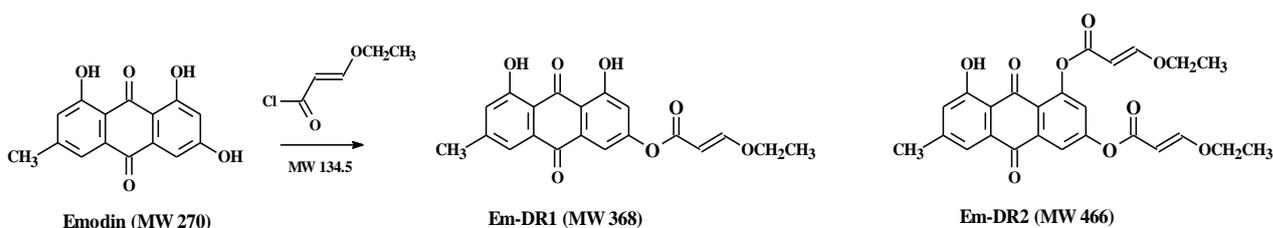


Figura 2 - Esquema representativo da síntese das derivatizações do emodin.

Para formação do Em-DR1, 5 mL de orto-diclorobenzeno (99%, AlfaAesar) foram adicionados a 0,54 g (2 mmol) de emodin puro (99,4%, ChemScene). A mistura foi submetida a agitação por 5 minutos a 50°C, com adição gradual de 0,3 g (3 mmol) de trietilamina (99,5%, Aldrich) originando uma solução castanho-avermelhada. Em seguida, foram adicionados 0,4 g (3 mmol) de cloreto de etoxi-acrilóilo (>88%, TCI). A solução foi agitada por 10 minutos a 60°C, apresentando coloração amarelo-acastanhada.

A segunda etapa da derivatização do Em-DR1 ocorreu pela adição de 0,2 g de trietilamina e cloreto de etoxi-acrilóilo à solução amarelo-acastanhada, submetidos posteriormente a agitação por 10 minutos sob aquecimento. A mistura foi filtrada para remoção de cloridrato de trietilamina ( $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ ) e o sal coletado foi lavado com 10 mL de acetato de etila (EtOAc). A parte que passou pelo filtro precipitou um sólido amarelo, que foi coletado, fornecendo 0,5 g de produto. Houve recristalização a partir da ebulição de 20 mL de EtOAc, formando 0,3 g de um pó amarelo.

Na di-acilação de emodin para formação do Em-DR2, foram adicionados 0,4 g de trietilamina e cloreto de etoxi-acrilóilo, ao invés de 0,2 g, como feito na segunda etapa anterior,

e a mistura foi submetida agitação por 10 minutos sob aquecimento. A mistura amarelo-acastanhada resultante foi filtrada para remover cloridrato de trietilamina e o sal coletado foi lavado com 10 mL de EtOAc. O filtrado evaporou-se parcialmente ao permanecer em repouso *overnight* no exaustor e a mistura foi diluída com 2:1 hexano/acetato de etilo. O sólido amarelo precipitado foi recolhido por filtração, originando 0,5 g de produto.

### 3.2. Ensaio de mutagenicidade *in vitro* com bactérias

Para avaliar a mutagenicidade dos produtos derivatizados, foi escolhido um protocolo miniaturizado do teste de Salmonella/microsoma denominado *Miniaturized Plate Assay*, MPA (ZWARG et al., 2018), devido à quantidade limitada de amostras disponíveis. Foram realizados ensaios com o emodin e com os compostos derivatizados para efeitos comparativos. Os testes foram realizados na ausência e na presença de sistema de ativação metabólica, obtido pela mistura S9 contendo fração microsomal de fígado de rato Sprague Dawley (S9) induzida por Aroclor 1254 (MolTox, Boone) e cofatores (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Como o emodin já havia sido previamente testado e apresentou mutagenicidade somente com a TA1537 na presença de ativação metabólica contendo 10% da fração S9 (BÖSCH et al., 1987), essa foi a linhagem escolhida para teste.

O teste foi realizado pela adição de 50 µL de suspensão de células concentrada 5 vezes e 2 µL da amostra teste a um tubo. Uma alíquota de 26 µL foi transferida para outro tubo contendo 25 µL de tampão de fosfato de sódio 0,015 M, e 25 µL de mistura S9 foi adicionado ao primeiro tubo. Após pré-incubação a 37°C por 90 minutos sob agitação, 1 mL de ágar de superfície foi adicionado a cada tubo, e 250 µL da mistura foram distribuídas em quatro poços de microplacas contendo cada um, 2,8 mL de ágar mínimo. As colônias foram contabilizadas manualmente, após incubação a 37°C por 66 horas.

Dimetilsulfóxido (DMSO) (SIGMA, ≥99,5%) foi utilizado como controle negativo, enquanto o controle positivo utilizado foi 9-aminoacridina (SIGMA, ≥99,5%) a 25 ng/µL para

teste sem ativação metabólica e 2-aminoantraceno (SIGMA,  $\geq 96\%$ ) a 20 ng/ $\mu$ L para testes com ativação metabólica. A toxicidade foi avaliada por uma inspeção cuidadosa do fundo das placas. Os corantes foram testados em experimentos de concentração resposta e os dados foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) ( $p < 0,05$ ), seguido por teste Tukey ( $p < 0,05$ ) e análise de regressão utilizando o modelo Bernstein (BERNSTEIN et al., 1982). A análise estatística foi realizada com o software Salanal.

### **3.3. Teste de genotoxicidade e mutagenicidade *in vivo* com *Parhyale hawaiiensis***

#### **3.3.1. Ensaio Cometa**

O ensaio cometa foi adaptado de LACAZE et al. (2010) e realizado com células da hemolinfa de *P. hawaiiensis*, seguindo as recomendações de MØLLER et al. (2020) para procedimentos de teste e análises. Organismos de *P. hawaiiensis* foram utilizados nos testes de genotoxicidade e mutagenicidade *in vivo* pois, além de sua representatividade e sensibilidade, possuem cultivo estabelecido no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG) desde 2012, de acordo com ARTAL et al. (2018). As culturas são mantidas em recipientes plásticos com 2 L de água do mar reconstituída (Red Sea Salt®, salinidade 30) a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12:12 horas (claro/escuro). A alimentação ocorre diariamente com uma ração para peixes (pellets JBL® Novo Fect). Duas vezes por semana, 1 L de água do mar dos recipientes de plástico é descartado e substituído por um novo. Uma vez por mês, os recipientes de plástico são completamente renovados e limpos.

Organismos de *P. hawaiiensis* de 8 meses de idade foram expostos por 96 horas a diferentes concentrações subletais do emodin e seus derivatizados para fins comparativos. A exposição foi realizada em microplacas de 12 poços, contendo um organismo por poço e 4 mL de amostra. Foram utilizados organismos machos e fêmeas para obter uma maior representatividade populacional e assegurar que o sexo não fosse um fator interferente nos resultados. Uma vez que não houve diferença estatística significativa entre organismos machos

e fêmeas no ensaio cometa (Anexo I), os resultados foram compilados para análise.

Os corantes foram diluídos de acordo com seus limites de solubilidade em DMSO e testados de forma que a concentração máxima de DMSO no ensaio fosse de 0,01%, (v/v), uma vez que esta é a concentração máxima de DMSO permitida (OCDE, 2019). O limite de solubilidade foi estabelecido de forma empírica, observando-se o volume dissolvido anteriormente ao início da formação de precipitado. Desta forma, o emodin foi testado a 0,3 mg/L, Em-DR1 a 0,15 mg/L e Em-DR2 a 1,25 mg/L. Como controle negativo, foi utilizado DMSO 0,01% em água do mar reconstituída, devido ao número limitado de lâminas na cuba de eletroforese e por não ter apresentado genotoxicidade nos testes preliminares. Etilmetanosulfonato (EMS) 0,2 mmol foi usado como controle positivo. Os parâmetros pH e salinidade dos meios de exposição foram medidos no início e no final do teste (Anexo II).

Decorrido o tempo de exposição de 96 horas, a hemolinfa foi coletada inserindo um fino capilar no segundo ou terceiro segmento de cada organismo exposto. Com o auxílio de uma bomba de ar, a amostra foi transferida para um eppendorf contendo 20 µL de água salina. O procedimento foi repetido para um organismo do mesmo sexo, de modo a formar um pool de 2 organismos. Em seguida, 20 µL de agarose de baixo ponto de fusão 1% foram adicionados, formando uma amostra. Uma alíquota de 20 µL da amostra foi adicionada à uma lâmina previamente recoberta com gel de agarose de ponto de fusão normal 1,5%, sendo recoberto com uma lamínula. O mesmo procedimento foi feito com mais dois organismos do mesmo sexo, de forma que cada lâmina ficou com dois géis. As lâminas preparadas foram deixadas por 20 min em uma geladeira a aproximadamente 4°C. Decorrido o tempo, as lamínulas foram removidas. As lâminas preparadas foram postas em uma cubeta de vidro, recobertas com a solução de lise final (2.5 M NaCl, 100 M EDTA, 10 mM tris, 4% laurilsarcosinato de sódio, 1% triton X-100, 10% DMSO, pH 10) e mantidas na geladeira por 2 horas. Após esta etapa, as lâminas foram retiradas da cubeta, lavadas com água salina gelada e adicionadas à cuba na etapa de *unwinding*.

As lâminas foram postas com o lado fosco virado para o eletrodo vermelho, recobertas com a solução de eletroforese gelada (1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 300 mM NaOH, pH>13) e mantidas em repouso por 5 minutos. Em seguida, nas condições de 20V e 300mA, foi iniciada a corrida por 20 minutos. Completado o período, as lâminas foram removidas da cuba e lavadas com solução de neutralização gelada (0.4 M tris, pH 7,5) por 5 min. O procedimento foi repetido mais duas vezes. Na etapa de fixação, as lâminas foram cobertas com etanol 100% durante 15 minutos e, posteriormente, deixadas à temperatura ambiente por 2 horas para secarem.

Paralelamente ao ensaio, foi realizado um teste de viabilidade celular. A viabilidade foi feita com diluição da hemolinfa em água salina e azul de tripano (0,4%, em água deionizada) e analisadas em uma câmara de Neubauer. Células não viáveis foram coradas de azul enquanto células viáveis não coraram. A viabilidade celular foi calculada como a porcentagem de células viáveis em relação ao total de células. Todas as amostras utilizadas apresentaram uma viabilidade maior ou igual a 80% (Anexo III).

A leitura do ensaio foi realizada em microscópio de fluorescência, medindo-se a porcentagem de DNA na cauda. O software utilizado para análise foi o Comet Score 2.0, sendo contabilizadas 100 cometas para cada gel. Para análise estatística, foi utilizado o software R. Primeiramente, os dados foram avaliados quanto à normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e, como os mesmos não apresentaram uma distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para avaliar diferenças entre as condições testadas.

### **3.3.2. Teste de micronúcleo**

O teste de micronúcleo foi realizado de acordo com BOTELHO et al. (2022). Foram realizados dois ensaios, sendo o primeiro em dose única no limite de solubilidade de cada amostra usando o máximo de 0,01% de DMSO no meio (OECD, 2019). O emodin foi testado a 0,3 mg/L, Em-DR1 a 0,15 mg/L e Em-DR2 a 1,25 mg/L. No segundo experimento, o emodin foi testado nas concentrações de 0,15 e 0,3 mg/L, enquanto o Em-DR1 foi testado nas

concentrações de 0,075 e 0,15 mg/L e o Em-DR2 nas concentrações de 0,15, 0,3 e 1,25 mg/L. DMSO 0,01% foi usado como controle negativo. Zinco ( $Zn^{2+}$ ) a 2,5 mg/L, preparado por meio da solução de sulfato de zinco heptahidratado ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , Sigma-Aldrich,  $\geq 99\%$ ), foi utilizado como controle positivo. Para cada teste, 10 organismos adultos de 8 meses de idade de *P. hawaiiensis* foram expostos por 96 horas, sendo 5 machos e 5 fêmeas, e os resultados de ambos os experimentos foram agrupados para análise dos dados. Os parâmetros físico-químicos do meio de exposição foram medidos no início e ao final do ensaio (Anexos IV e V). Assim como no ensaio cometa, foram utilizados organismos machos e fêmeas para obter uma maior representatividade populacional e assegurar que o sexo não fosse um fator interferente nos resultados. Uma vez que não houve diferença estatística significativa entre organismos machos e fêmeas no teste de micronúcleo (Anexo VI), os resultados foram compilados para análise.

Os micronúcleos foram observados nos hemócitos dos organismos. A remoção da hemolinfa ocorreu por meio de um capilar de vidro inserido no segundo ou terceiro segmento do organismo que, em seguida, foi transferido a um vial contendo 10  $\mu$ L de água do mar reconstituída gelada (Red Sea Salt®; salinidade 30). A suspensão foi adicionada à uma lâmina, permanecendo em uma câmara úmida por 15min e, após, foram lavadas duas vezes com água do mar reconstituída. A fixação foi feita utilizando formaldeído (1:10 em água salina) por 10 min em uma câmara úmida. Depois de secas, as lâminas foram imersas em metanol por 10 min e, após, coradas com Giemsa 10% por 20 min. A análise foi feita por meio da contagem de 500 células de cada lâmina, contabilizando a quantidade de micronúcleos formados utilizando um microscópio óptico (Nikon Eclipse Ci) em 1000x. A análise estatística foi feita no software RStudio, realizando primeiramente o teste de normalidade Shapiro-Wilk e teste de homoscedasticidade de Bartlett. Como os dados não apresentaram distribuição normal, foram realizados os testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney para comparação da diferença entre as condições dos testes ( $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Derivatização do emodin

A derivatização do emodin foi eficiente utilizando o cloreto de etoxi-acrilóflor, que se associou aos grupos hidróxidos da molécula de emodin, formando o Em-DR1 e Em-DR2. As características estruturais do Em-DR1 e Em-DR2 foram geradas usando o software Gaussian, indicando que a formação de moléculas não planares foi obtida com sucesso (Figura 3).

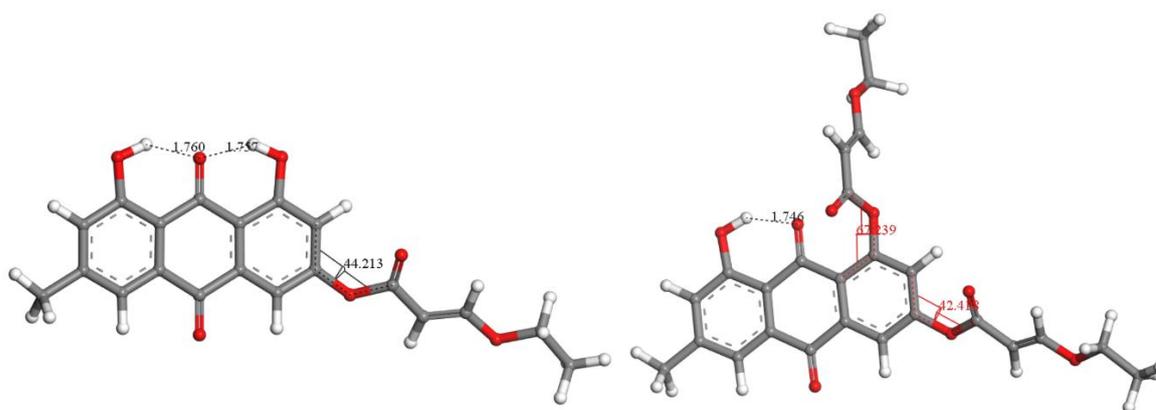


Figura 3 - Estruturas do Em-DR1, à esquerda, e Em-DR2, à direita.

### 4.2. Ensaio de mutagenicidade *in vitro* com bactérias

A mutagenicidade do emodin foi confirmada com ativação metabólica para a linhagem TA1537 (Tabela 1), confirmando que o composto necessita ser metabolizado para ser mutagênico. De acordo com MASUDA e UENO (1984), após ser metabolizado, o emodin forma o metabólito 2-hidroxiemodin, sendo um composto mutagênico. Esses dados são consistentes com os resultados da literatura, já que o emodin e outras hidroxiantraquinonas foram previamente descritos como sendo mutagênicos que causam danos no DNA do tipo deslocamento do quadro de leitura (WEHNER; P. G. THIEL, 1979; BROWN; DIETRICH; BROWN, 1977; BROWN; BROWN, 1976). Os produtos de modificação Em-DR1 e Em-DR2

também foram mutagênicos (Tabela 1), indicando que a modificação estrutural não foi suficiente para completa remoção da mutagenicidade do composto.

Tabela 1 - Dados de mutagenicidade do emodin e seus produtos derivatizados (Em-DR1 e Em-DR2) representado pela média  $\pm$  desvio padrão (DP) do número de revertentes, para a linhagem TA 1537 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica usando 10% de S9.

		<b>Emodin</b>				<b>Em-DR1</b>				<b>Em-DR2</b>							
Concentração		-S9		+S9		Concentração		-S9		+S9		Concentração		-S9		+S9	
(ng/ $\mu$ L)	( $\mu$ g/L)	Média	$\pm$ DP	Média	$\pm$ DP	(ng/ $\mu$ L)	( $\mu$ g/L)	Média	$\pm$ DP	Média	$\pm$ DP	(ng/ $\mu$ L)	( $\mu$ g/L)	Média	$\pm$ DP	Média	$\pm$ DP
DMSO <sup>a</sup>		1.75	0.96	2.00	1.41	DMSO <sup>a</sup>		1.75	0.5	2.00	1.41	DMSO <sup>a</sup>		1.75	0.5	2.00	1.41
3.7	3700	1.75	0.96	<b>6.75</b>	<b>0.96</b>	3.12	3120	1.75	1.71	4.00	2.16	3.9	3900	1.75	0.96	4.00	1.63
7.5	7500	2.25	1.26	<b>6.50</b>	<b>1.29</b>	6.24	6240	2.00	1.63	<b>6.75</b>	<b>1.50</b>	7.8	7800	2.25	1.71	4.50	1.00
15	15000	1.50	1.73	<b>15.25</b>	<b>2.50</b>	12.5	12500	2.00	2.16	<b>11.25</b>	<b>1.89</b>	15.6	15600	2.50	1.73	<b>8.00</b>	<b>1.63</b>
Controle positivo		>150		>150		Controle positivo		>150		>150		Controle positivo		>150		>150	
Resposta		Negativo		<b>Positivo</b>		Resposta		Negativo		<b>Positivo</b>		Resposta		Negativo		<b>Positivo</b>	

<sup>a</sup> controle negativo. \* significativo (p<0,05)

### **4.3. Ensaio de genotoxicidade e mutagenicidade *in vivo* com *Parhyale hawaiiensis***

#### **4.3.1. Ensaio Cometa**

Foi realizado o ensaio com o emodin e seus produtos derivatizados. O emodin não demonstrou genotoxicidade detectada no ensaio cometa para as células da hemolinfa de *Parhyale hawaiiensis* após 96 horas de exposição nas duas concentrações testadas, uma vez que não houve diferença estatística em relação ao controle negativo. O controle positivo respondeu adequadamente. Não houve diferença estatística do controle negativo em relação ao emodin e seus produtos derivatizados, indicando que eles não foram genotóxicos para células da hemolinfa de *P. hawaiiensis* nas concentrações testadas (Figura 4).

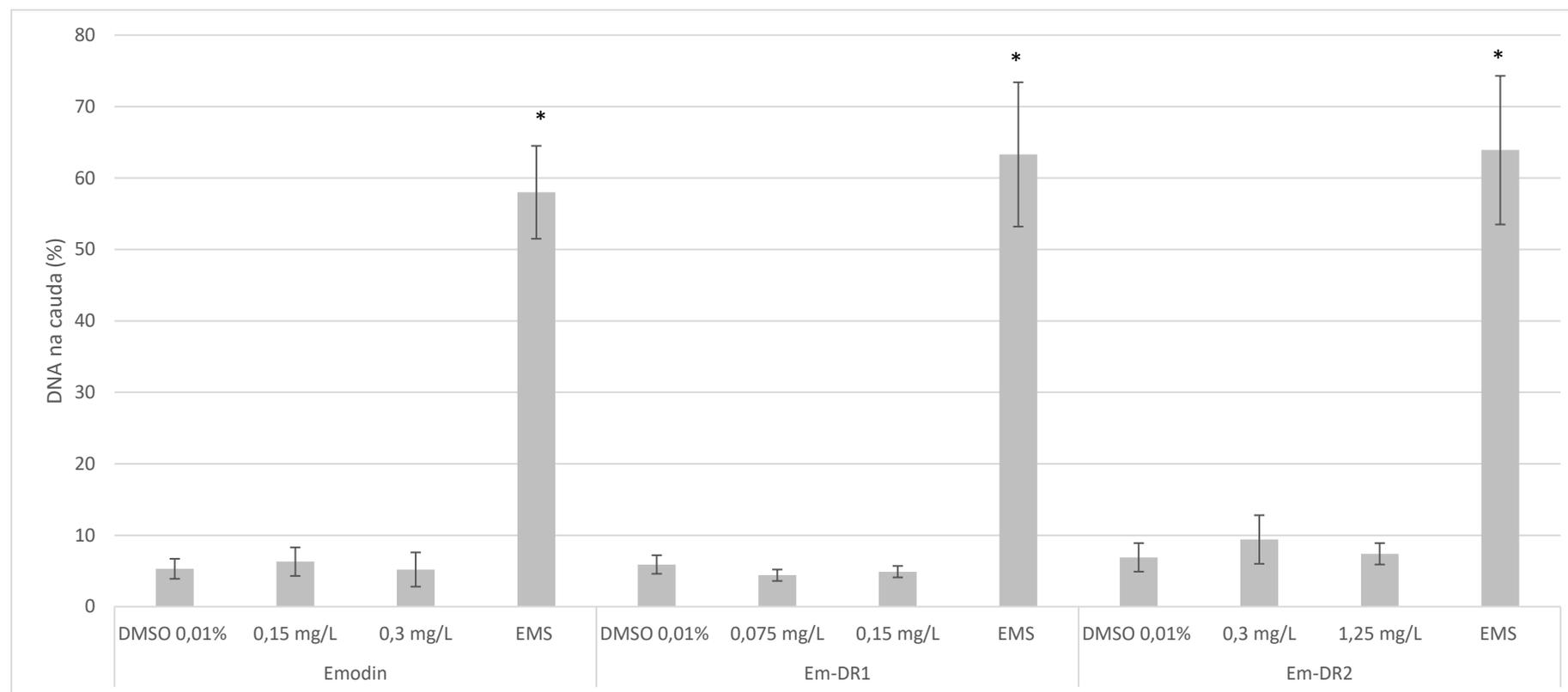


Figura 4 - Média da porcentagem de DNA na cauda nas células da hemolinfa de *P. hawaiiensis* após exposição *in vivo* ao emodin e seus produtos derivatizados (Em-DR1 e Em-DR2) por 96 horas. As barras de erro representam o erro padrão. (\*): estatisticamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ).

O presente resultado corrobora com os resultados de MÜLLER et al. (1996), que observou que o emodin não foi genotóxico após exposição *in vitro* de células de ratos expostas por 5 horas a 13,5 µg/L de emodin, utilizando o ensaio cometa. Entretanto, os resultados divergem de GO et al. (2007), que observou genotoxicidade em células de ratos expostas *in vitro* em concentrações maiores (7.500 - 30.000 µg/L), por 2 horas, com e sem ativação metabólica (S9).

#### **4.3.2. Teste de micronúcleo**

O emodin e seus dois produtos derivatizados, Em-DR1 e Em-DR2, aumentaram de forma significativa a frequência de micronúcleos em experimentos *in vivo* usando o organismo aquático *P. hawaiiensis* (Figuras 5 e 6), corroborando com os resultados obtidos no ensaio *in vitro* de Salmonella/microsoma.

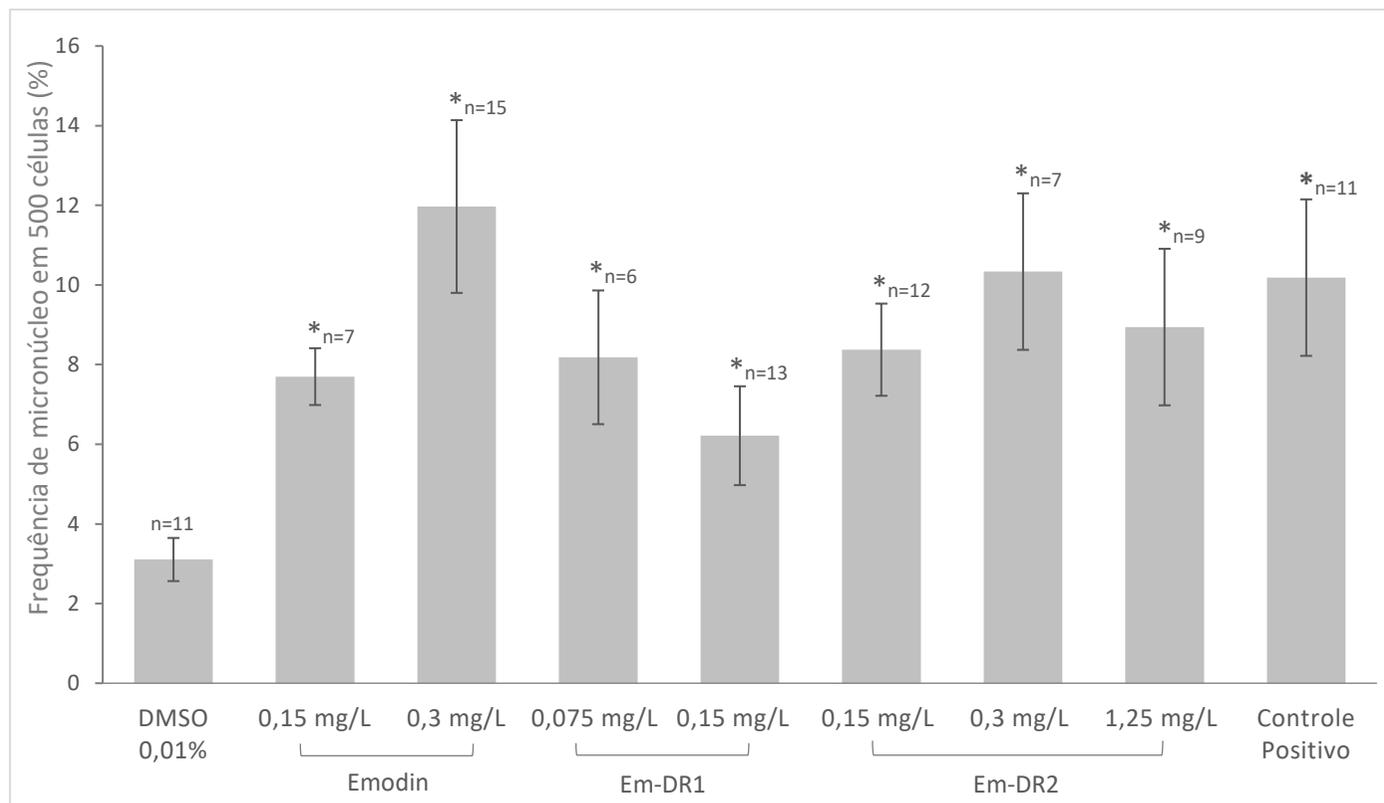


Figura 5 - Frequência de micronúcleos (%) em 500 células da hemolinfa de *P. hawaiiensis* para cada exposição. A barra de erro representa o erro padrão. (\*): estatisticamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ). (n): número de organismos analisados.

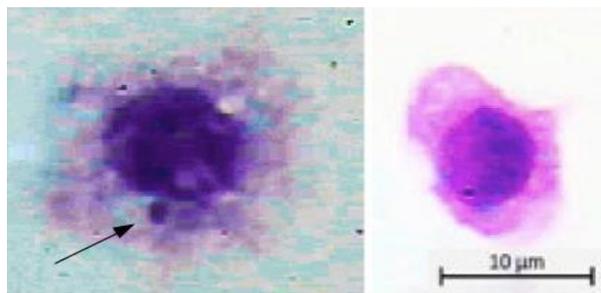


Figura 6 - Células da hemolinfa de *Palyale hawaiiensis* avaliadas no ensaio de micronúcleo. À esquerda, célula com micronúcleo, indicado pela seta preta. À direita, célula sem micronúcleo. Autoria: Marina Tenório Botelho.

O Em-DR1 apresentou uma solubilidade menor que o emodin e o Em-DR2 e, mesmo sendo testado no limite de solubilidade em DMSO, foi observado a formação de um precipitado após 96h de exposição. Portanto, o composto poderia estar menos biodisponível para *P. hawaiiensis*, interferindo na avaliação de seu potencial mutagênico para este organismo. Para ensaios futuros, poderia-se testar esses produtos por outras vias de exposição, como a alimentar.

O protocolo do teste de micronúcleo para avaliar a mutagenicidade em células de hemolinfa de *P. hawaiiensis* é novo e pode ser aprimorado testando outras substâncias. Além disso, o baixo número de células presentes na hemolinfa é um fator limitante na análise. Uma vez que a frequência de micronúcleos é baixa (Figura 5), um maior número de células (n) deve ser analisado em cada condição, permitindo uma maior detecção de micronúcleos e uma análise estatística mais robusta. Para isso, a solução seria expor um maior número de organismos para garantir um mínimo de 5000 células por condição.

O presente trabalho foi pioneiro em avaliar a mutagenicidade do emodin utilizando um anfípode marinho. Não há dados na literatura acerca da mutagenicidade do emodin em organismos aquáticos, entretanto, trabalhos em células de mamíferos terrestres estão disponíveis na literatura. Ao expor células de ratos machos e fêmeas por até 48 horas a 2000

mg/kg de peso corpóreo por dia de emodin, autores não observaram aumento da frequência de micronúcleo em relação ao controle negativo (MENGS; KRUMBIEGEL; VÖLKNER, 1997). Entretanto, ao expor células humanas do linfoblastoide ao emodin em concentrações de até 80.000 µg/L, LI et al. (2010) observaram aumento da frequência de micronúcleo e efeito genotóxico no ensaio cometa.

## 5. CONCLUSÃO

Produtos derivatizados do emodin (Em-DR1 e Em-DR2) foram obtidos com sucesso utilizando cloretos de acrilóila para serem utilizados no processo de tingimento por plasma atmosférico. Os produtos derivatizados perderam sua planaridade em relação ao emodin, entretanto, foram mutagênicos para a linhagem TA1537 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, com ativação metabólica (S9). Os produtos derivatizados não foram genotóxicos em células de hemolinfa de *P. hawaiiensis*, mas induziram a formação de micronúcleos no ensaio de micronúcleo. Embora os presentes derivatizados sejam uma alternativa para tingimento por plasma atmosférico, não apresentam ser uma alternativa do ponto de vista de saúde humana e ambiental. Esse trabalho é pioneiro na avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade *in vivo* de uma antraquinona utilizando um organismo aquático e mostra a importância de avaliar novos corantes, tanto os naturais, como modificados quimicamente, quanto às suas propriedades mutagênicas antes do seu oferecimento para o mercado.

## REFERÊNCIAS

ALI, H. Biodegradation of synthetic dyes - A review. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 213, n. 1–4, p. 251–273, 2010.

AMES, B. N.; LEE, F. D.; DURSTON, W. E. An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens (Salmonella typhimurium/lipopolysaccharide/frameshift mutations). v. 70, n. 3, p. 782–786, 1973.

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

ARTAL, M. C. et al. Transcriptome analysis in *Parhyale hawaiiensis* reveal sex-specific responses to AgNP and AgCl exposure. **Environmental Pollution**, v. 260, 2020.

BERNSTEIN, L. et al. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 97, n. 4, p. 267–281, 1982.

BÖSCH, R. et al. Investigations on DNA binding in rat liver and in Salmonella and on mutagenicity in the Ames test by emodin, a natural anthraquinone. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 188, n. 3, p. 161–168, 1987a.

BÖSCH, R. et al. Investigations on DNA binding in rat liver and in Salmonella and on mutagenicity in the Ames test by emodin, a natural anthraquinone. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 188, n. 3, p. 161–168, 1987b.

BOTELHO, M. T. et al. Genotoxic effects of silver nanoparticles on a tropical marine amphipod via feeding exposure. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 881, n. June, 2022.

BUTRIMAVIČIENĒ, L. et al. Environmental genotoxicity and risk assessment in the Gulf of Riga (Baltic Sea) using fish, bivalves, and crustaceans. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 25, p. 24818–24828, 2018.

CARMEN, Z.; DANIEL, S. Textile Organic Dyes – Characteristics, Polluting Effects and Separation/Elimination Procedures from Industrial Effluents – A Critical Overview. **Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention - Environmental and Analytical Update**, 2012.

ELABID, A. E. A. et al. Improving the low temperature dyeability of polyethylene terephthalate fabric with dispersive dyes by atmospheric pressure plasma discharge. **Applied Surface Science**, v. 375, p. 26–34, 2016.

GAJSKI, G. et al. The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 1 Invertebrates). **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 779, n. February, p. 82–113, 2019.

GLAZIER, D. S. Amphipoda. **Encyclopedia of Inland Waters**, p. 89–115, 2009.

GO, S.-Y. et al. Genetic Toxicity Test of Emodin by Ames, Micronucleus, Comet Assays and Microarray Analysis Showing Differential Result. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 15, n. 3, p. 192–198, 2007.

HERRALA, M. et al. Waterless Dyeing and In Vitro Toxicological Properties of Biocolorants from *Cortinarius sanguineus*. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 11, 2022.

HYATT, J. A. Liquid and Supercritical Carbon Dioxide as Organic Solvents. **Journal of Organic Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 3246, 1985.

IARC. Some chemicals present in industrial and consumer products, food and drinking-water. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer**, v. 101, p. 9–549, 2012.

JAVAID, R.; QAZI, U. Y. Catalytic oxidation process for the degradation of synthetic dyes: An overview. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 11, p. 1–27, 2019.

LAINING, I. G. The impact of effluent regulations on the dyeing industry. **Review of Progress in Coloration and Related Topics**, v. 21, n. 1, p. 56–71, 1991.

LI, Y. et al. Emodin triggers DNA double-strand breaks by stabilizing topoisomerase II-DNA cleavage complexes and by inhibiting ATP hydrolysis of topoisomerase II. **Toxicological Sciences**, v. 118, n. 2, p. 435–443, 2010.

LIBERMAN, D. F. et al. Mutagenicity of anthraquinone and hydroxylated anthraquinones in the Ames/Salmonella microsome system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1354–1359, 1982.

MASUDA, T.; UENO, Y. Microsomal transformation of emodin into a direct mutagen. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 125, n. 2, p. 135–144, 1984.

MENGS, U.; KRUMBIEGEL, G.; VÖLKNER, W. Lack of emodin genotoxicity in the mouse micronucleus assay. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 393, n. 3, p. 289–293, 1997.

MØLLER, P. et al. Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. **Nature Protocols**, v. 15, n. 12, p. 3817–3826, 2020.

MONTERO, G. A. et al. Supercritical fluid technology in textile processing: An overview. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 39, n. 12, p. 4806–4812, 2000.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay Kristien. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, p. 29–60, 2000.

OBIAKOR, M.; OKONKWO, J. Eco-genotoxicology: Micronucleus Assay in Fish Erythrocytes as In situ Aquatic Pollution Biomarker: a Review. **Journal of Animal ...**, v. 2, n. 1, p. 123–133, 2012.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Ekp**, v. 13, n. 3, p. 576, 1984.

RÄISÄNEN, R. Fungal colorants in applications – focus on Cortinarius species. **Coloration Technology**, v. 135, n. 1, p. 22–31, 2019.

RÄISÄNEN, R.; MONTERO, G. A.; FREEMAN, H. S. A fungal-based anthraquinone emodin for polylactide and polyethylene terephthalate in supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) dyeing. **Color Research and Application**, n. January, p. 1–7, 2021.

RÄISÄNEN, R.; NOUSIAINEN, P.; HYNNINEN, P. H. Emodin and Dermocybin Natural Anthraquinones as Mordant Dyes for Wool and Polyamide. **Textile Research Journal**, v. 71, n. 11, p. 1016–1022, 2001.

ROUTOULA, E.; PATWARDHAN, S. V. Degradation of Anthraquinone Dyes from Effluents: A Review Focusing on Enzymatic Dye Degradation with Industrial Potential. **Environmental Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 647–664, 2020.

SANTOS, A. DOS et al. The amphipod Parhyale hawaiiensis as a promising model in ecotoxicology. **Chemosphere**, v. 307, n. April, 2022.

SOMMER, S.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. Micronucleus assay: The state of art, and future directions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 7–9, 2020.

UMBUZEIRO, G. D. A.; HERINGA, M.; ZEIGER, E. In vitro genotoxicity testing: Significance and use in environmental monitoring. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 157, p. 59–80, 2017.

UMBUZEIRO, G. DE A. et al. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. **Chemosphere**, v. 60, n. 1, p. 55–64, 2005.

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.

WEBER, L. et al. Genotoxic effects of the water-soluble fraction of heavy oil in the brackish/freshwater amphipod *Quadrivisia aff. lutzi* (Gammaridea) as assessed using the comet assay. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 4, p. 642–655, 2013.

WEHNER, F. C.; THIEL, P. G.; RAND, M. DU. Mutagenicity of the Mycotoxin Emodin in the Salmonella/ Microsome System. v. 37, n. 3, p. 658–660, 1979.

ZAIDY, S. S. H. et al. Approach to Waterless Dyeing of Textile Substrates - Use of Atmospheric Plasma. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 58, n. 40, p. 18478–18487, 2019.

ZHENG, H. et al. An ecofriendly dyeing of wool with supercritical carbon dioxide fluid. **Journal of Cleaner Production**, v. 143, p. 269–277, 2017.

ZWARG, J. R. R. M. et al. Miniaturization of the microsuspension Salmonella/microsome assay in agar microplates. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 59, n. 6, p. 488–501, 2018.

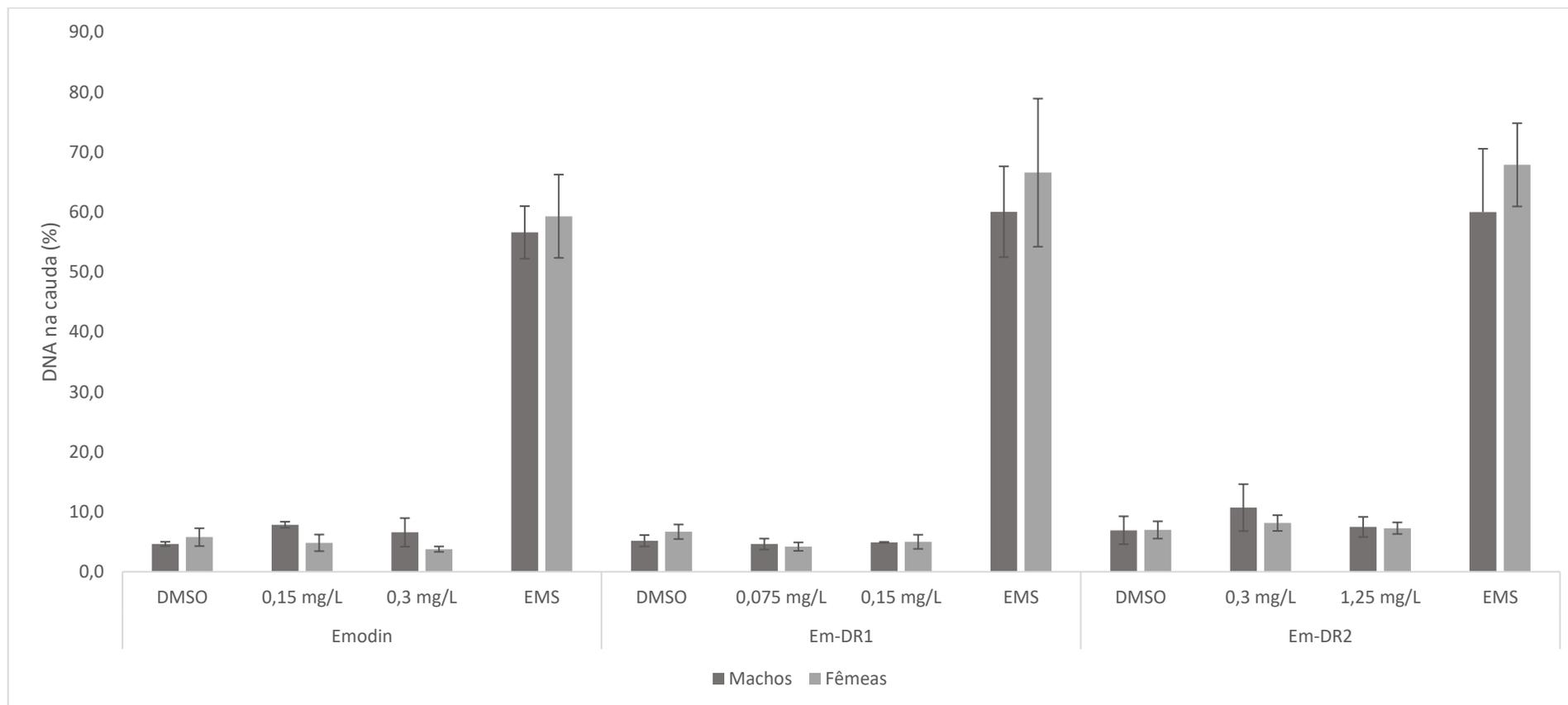
**ANEXO I - RESULTADOS DO ENSAIO COMETA PARA ORGANISMOS MACHOS E FÊMEAS DE *P. HAWAIENSIS***

Figura 7 - Média da porcentagem de DNA na cauda nas células da hemolinfa de *P. hawaiiensis* de organismos machos e fêmeas após exposição *in vivo* ao emodin e seus produtos derivatizados (Em-DR1 e Em-DR2) por 96 horas. As barras de erro representam o erro padrão.

## ANEXO II - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO ENSAIO COMETA

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos do ensaio cometa anteriormente e após exposição de 96h de *P. hawaiiensis* a emodin, Em-DR1 e Em-DR2

Ensaio	Exposição	pH		Salinidade	
		Inicial	Final	Inicial	Final
Emodin	DMSO 0,01%	8,13	8,03	30,75	30,75
	0,15 mg/L	8,12	8,13	31,93	31,19
	0,3 mg/L	8,15	8,09	31,11	32,71
	EMS	8,14	7,03	29,34	32,11
Em-DR1	DMSO 0,01%	8,28	8,03	32,50	32,58
	0,075 mg/L	8,30	8,06	32,19	32,73
	0,15 mg/L	8,30	8,05	32,33	32,88
	EMS	8,23	7,38	31,86	32,70
Em-DR2	DMSO 0,01%	8,25	7,97	31,53	30,05
	0,3 mg/L	8,28	8,06	30,98	30,04
	1,25 mg/L	8,30	8,03	31,17	30,16
	EMS	8,24	7,06	31,21	29,27

### ANEXO III - VIABILIDADE CELULAR

Tabela 3 - Viabilidade das células de *P. hawaiiensis* no ensaio cometa após exposição de 96h a emodin, Em-DR1 e Em-DR2

Viabilidade – Ensaio Cometa Emodin					
Ensaio	Exposição	Sexo	Nº de células viáveis	Nº de células não viáveis	Viabilidade (%)
Emodin	DMSO	Machos	42	0	100
		Fêmeas	64	0	100
	0,15 mg/L	Machos	34	1	97
		Fêmeas	58	0	100
	0,3 mg/L	Machos	19	0	100
		Fêmeas	30	0	100
	EMS	Machos	24	1	96
		Fêmeas	186	0	100
Em-DR1	DMSO	Machos	7	0	100
		Fêmeas	9	0	100
	0,075 mg/L	Machos	19	0	100
		Fêmeas	42	0	100
	0,15 mg/L	Machos	120	0	100
		Fêmeas	394	0	100
	EMS	Machos	42	0	100
		Fêmeas	10	0	100
Em-DR2	DMSO	Machos	47	0	100
		Fêmeas	212	0	100
	0,3 mg/L	Machos	43	0	100
		Fêmeas	8	0	100
	1,25 mg/L	Machos	159	0	100
		Fêmeas	15	0	100
	EMS	Machos	20	0	100
		Fêmeas	23	0	100

**ANEXO IV - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO PRIMEIRO ENSAIO DE  
MICRONÚCLEO**

Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos do primeiro ensaio de micronúcleo anteriormente e após exposição de 96h de *P. hawaiiensis* a emodin, Em-DR1 e Em-DR2.

	<b>pH</b>		<b>Salinidade</b>	
	Inicial	Final	Inicial	Final
DMSO 0,01%	8,34	8,08	30,34	30,38
Emodin 0,3 mg/L	8,38	7,94	30,52	30,50
Em-DR1 0,15 mg/L	8,37	7,94	30,32	30,38
Em-DR2 1,25 mg/L	8,39	7,94	30,76	31,09
Zinco 2,5 mg/L	8,34	8,11	29,85	29,76

**ANEXO V - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO SEGUNDO ENSAIO DE  
MICRONÚCLEO**

Tabela 5 - Parâmetros físico-químicos do segundo ensaio de micronúcleo anteriormente e após exposição de 96h de *P. hawaiiensis* a emodin, Em-DR1 e Em-DR2.

	Concentração (mg/L)	pH		Salinidade	
		Inicial	Final	Inicial	Final
DMSO 0,01%	-	8,08	7,96	32,06	32,79
Emodin	0,15	8,16	8,31	32,45	30,43
	0,30	8,17	8,31	32,39	30,78
Em-DR1	0,075	8,11	8,19	30,51	30,69
	0,15	8,13	8,34	32,19	30,84
Em-DR2	0,15	8,11	8,34	32,18	30,78
	0,30	8,10	8,40	31,96	30,76
	1,25	8,10	8,35	32,25	30,77
Zinco	2,5	8,01	7,97	32,27	32,80

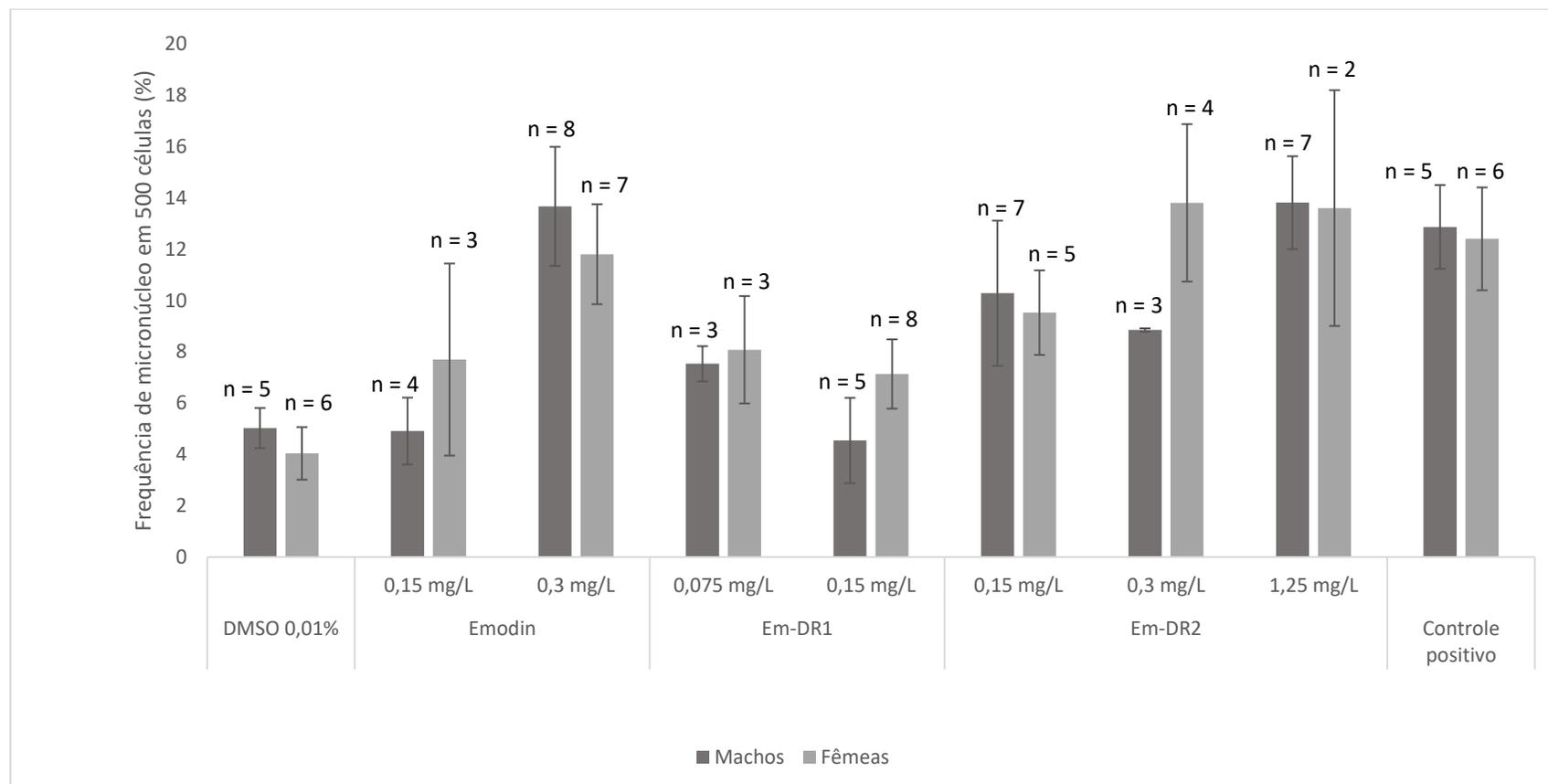
**ANEXO VI – RESULTADO DO ENSAIO DE MICRONÚCLEO PARA ORGANISMOS MACHOS E FÊMEAS DE *P. HAWAIENSIS***


Figura 8 - Frequência de micronúcleos (%) em 500 células da hemolinfa de *P. hawaiiensis* de organismos machos e fêmeas para cada exposição. A barra de erro representa o erro padrão. (n): número de organismos analisados.