



MARIANA COLETTY ARTAL

**“APLICAÇÃO DE TESTE DE TOXICIDADE COM O  
COPÉPODO MARINHO *Nitokra sp.* NA AVALIAÇÃO DE  
CORANTES”**

***“THE USE OF THE MARINE COPEPOD – *Nitokra sp.* IN  
THE TOXICITY EVALUATION OF DYES”***

**LIMEIRA**

**2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE TECNOLOGIA**

**MARIANA COLETTY ARTAL**

**“APLICAÇÃO DE TESTE DE TOXICIDADE COM O COPÉPODO MARINHO  
*Nitokra sp.* NA AVALIAÇÃO DE CORANTES”**

**Orientadora: Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro**

**Co-orientador: Dr. Guilherme Ribeiro Lotufo**

***“THE USE OF THE MARINE COPEPOD – *Nitokra sp.* IN THE TOXICITY  
EVALUATION OF DYES”***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia da Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia na área de concentração Tecnologia e Inovação

*Master degree submitted to the Graduate Program in Technology, Faculty of Technology, State University of Campinas for obtaining the title of Master in Technology in the concentration area of Technology and Innovation*

**LIMEIRA**

**2013**

iii

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR VANESSA EVELYN COSTA CRB-8/8295  
BIBLIOTECA UNIFICADA FT/CTL  
UNICAMP

Artal, Mariana Coletty, 1981-  
Ar75a Aplicação de teste de toxicidade com o copépodo marinho *Nitokra* sp. na avaliação de corantes / Mariana Coletty Artal. -  
Limeira, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Invertebrado marinho. 2. Ecotoxicidade. 3. Corantes.  
I. Umbuzeiro, Gisela de Aragão. II. Lotufo, Guilherme Ribeiro. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Tecnologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: The use of the marine copepod – *Nitokra* sp. in the toxicity evaluation of dyes.

Palavras-chave em inglês (Keywords):

- 1- Marine invertebrate.
- 2- Ecotoxicity.
- 3- Dyes.

Área de concentração: Tecnologia e Inovação

Titulação: Mestre em Tecnologia

Banca examinadora: Gisela de Aragão Umbuzeiro, Fábio Kummrow, Elisangela Franciscon Guimaro Dias.

Data da Defesa: 05-02-2013

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia

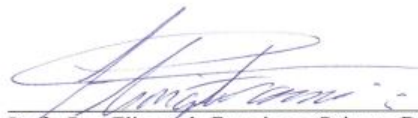
**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM TECNOLOGIA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: TECNOLOGIA E INOVAÇÃO**

Aplicação de teste de toxicidade com o copépodo marinho *Nitokra sp.* na avaliação de corantes

**Autor:** Mariana Coletty Artal

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro  
FT/UNICAMP

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Dra. Elisângela Franciscon Guimaro Dias  
FT/UNICAMP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Fábio Kummrow  
UNIFESP

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a minha mãe Silvia, responsável por me formar a pessoa que sou, pelo amor incondicional, pelas horas incontáveis de trabalho para garantir meus estudos, por fazer dos seus sonhos os meus me permitindo voar para onde eu escolhesse trilhando caminhos que muitas vezes me levavam para longe.

## **Agradecimentos**

Ao meu pai Paulo que sonha, viaja comigo e me apoia em todas as decisões. A minha irmã, Ana Carolina, companheira de vida e de todos os momentos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Gisela Umbuzeiro, pela orientação que ultrapassa os ensinamentos acadêmicos, pelo carinho, paciência e dedicação.

Ao meu co-orientador, Guilherme Lotufo, pela contribuição e orientação.

À Anjaina, Josiane e Francine pela ajuda, carinho, amizade e compreensão em quase todos os momentos. À Ádria pela ajuda, trabalho e luta diária.

Aos amigos da pós pela amizade e divisão das responsabilidades.

Às queridas alunas Amanda e Tsai, que me ajudam, se dedicam e tratam os bichos com carinho e respeito.

Aos amigos de Limeira e Ribeirão que fazem da vida mais divertida e compartilham dos momentos de descontração, sem os quais nenhum trabalho seria possível.

À Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni e Juliano Carvalho pelo tratamento dos corantes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento desta pesquisa.

*“Renda-se, como eu me rendi.  
Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei.  
Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.”*  
(Clarice Lispector)

## RESUMO

A produção e uso de corantes representam números relevantes no mundo e no Brasil. Efeitos ecotoxicológicos desses compostos, especialmente frente a organismos estuarinos e marinhos são ainda pouco explorados. Neste estudo avaliou-se a toxicidade dos azo corantes C.I. Disperse Red 1 e C.I. Disperse Red 13 para o copépodo estuarino *Nitokra sp.* avaliando efeitos adversos como a imobilidade e o sucesso de eclosão dos ovos antes e após tratamento fotoeletroquímico. Os corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 apresentaram toxicidade para o teste de imobilidade com concentração efetiva CE50(96h) de 0,3 a 2,1 mg.L<sup>-1</sup> (n=4) e 1,5 mg.L<sup>-1</sup> (n=2), respectivamente. As concentrações que causaram efeitos adversos na taxa de eclosão de ovos foram maiores ou próximas à CE50 de imobilidade, demonstrando que esse *endpoint* não foi mais sensível como esperado. Testes realizados após o tratamento fotoeletroquímico dos mesmos corantes mostraram que a toxicidade tanto no teste de imobilidade quando no teste de sucesso de eclosão de ovos foi reduzida. Esse tratamento mostra-se promissor para o tratamento desses compostos, porém, cabe ressaltar que a utilização de sal para o tratamento é interferente e causa toxicidade quando descartado ou disposto em ambientes de água doce.

**PALAVRAS-CHAVE:** Invertebrado marinho; Ecotoxicidade; Corantes.



## ABSTRACT

Production and use of dyes represent relevant numbers in the world and in Brazil. Ecotoxicological effects of these compounds, especially to estuarine and marine organisms are unknown. This study evaluated the toxicity of the azo dye CI Disperse Red 1 and CI Disperse Red 13 to an estuarine copepod *Nitokra sp.* evaluating adverse effects measured as immobility and egg hatching success before and after photoelectrochemical treatment. Both dyes Disperse Red 1 and Disperse Red 13 were toxic with immobility effective concentration EC50 (96h) in the range of 0.3 to 2.1 mg.L<sup>-1</sup> (n= 4) and 1.5 mg.L<sup>-1</sup> (n= 2), respectively. The concentrations that caused adverse effects on the success of eggs hatching were higher or close to the EC50 immobility, demonstrating that this is not the most sensitive *endpoint* as expected. Tests performed after photoelectrochemical treatment showed that the toxicity of both tests was reduced. This treatment shows promise for the treatment of these compounds, however, it is worth noting that the use of salt for treatment is interfering and cause toxicity when discarded or disposed of in freshwater environments.

**KEYWORDS:** Marine invertebrate; Ecotoxicity; Dyes.

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Espécies aquáticas utilizadas para avaliação de corantes.....	6
<b>Quadro 2.</b> Toxicidade do corante comercial Disperse Red 1 à diferentes espécies aquáticas.....	8

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Diferentes estágios pós-embrionários do copépodo harpacticóide <i>Tigriopus japonicus</i> . N1-N6 estágios de náuplios, C1-C5 estágios de copepoditos, e adultos de copépodos .....	3
<b>Figura 2.</b> <i>Nitokra sp.</i> A- adulto; B- náuplio.....	4
<b>Figura 3.</b> Estrutura química do Disperse Red 13.....	14
<b>Figura 4.</b> Esquema do reator fotoeletroquímico utilizado nos tratamentos dos corantes .....	18
<b>Figura 5.</b> Carta-controle do <i>Nitokra sp.</i> CE50(96h), resultados expressos em Zn. Média representada pela linha contínua e limites superiores e inferiores a dois desvios padrões pela linha tracejada.....	19
<b>Figura 6.</b> Monitoramento da absorbância do corante Disperse Red 1 (20mg.L <sup>-1</sup> ) durante o tratamento fotoeletroquímico.....	21
<b>Figura 7.</b> Curva dose-resposta do <i>Nitokra sp.</i> exposto ao corante Disperse Red 1 e a amostra do tratamento fotoeletroquímico. ....	22
<b>Figura 8.</b> Monitoramento da absorbância durante o tratamento fotoeletroquímico do Disperse Red 13 durante os tempos 0, 60 e 120 min de tratamento. ....	24
<b>Figura 9.</b> Curva dose-resposta do <i>Nitokra sp.</i> exposto ao corante Disperse Red 13 e a amostra do tratamento fotoeletroquímico.....	25

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Componentes do corante comercial Disperse Red 1.....	13
<b>Tabela 2.</b> Resumo das condições utilizadas no teste de imobilidade com <i>Nitokra sp.</i> .....	16
<b>Tabela 3.</b> Resumo das condições utilizadas no teste de sucesso de eclosão com <i>Nitokra sp.</i> .....	17
<b>Tabela 4.</b> Valores de CE50 e intervalos de confiança obtidos nos testes de imobilidade com <i>Nitokra sp.</i> exposto ao corante Disperse Red 1.....	20
<b>Tabela 5.</b> Resultados dos testes de eclosão realizados com <i>Nitokra sp.</i> após exposição a zinco expresso em CEO para o <i>endpoint</i> eclosão de ovos em comparação com a CE50 das fêmeas imóveis.....	26
<b>Tabela 6.</b> Resultados dos testes de sucesso de eclosão realizados com <i>Nitokra sp.</i> exposto ao corante Disperse Red 1 com <i>endpoint</i> de sucesso de eclosão e CE50 das fêmeas imóveis.....	27
<b>Tabela 7.</b> Resultados dos testes de sucesso de eclosão realizados com <i>Nitokra sp.</i> exposto ao corante Disperse Red 13 com <i>endpoint</i> de sucesso de eclosão e CE50 das fêmeas imóveis.....	27
<b>Tabela 8.</b> Resultados dos testes de sucesso de eclosão realizados com <i>Nitokra sp.</i> exposto aos produtos gerados do tratamento fotoeletroquímico realizado com os corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 com <i>endpoint</i> de sucesso de eclosão e CE50 das fêmeas imóveis.....	28
<b>Tabela 9.</b> Resumo dos resultados da exposição do <i>Nitokra sp.</i> aos corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 antes e após tratamento fotoeletroquímico.....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcentagem

°C – Grau Celsius

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

Ag - Prata

AgCl – Cloreto de Prata

CAS – Chemical Abstracts Service

CEO – Concentração de Efeito Observado

CENO – Concentração de Efeito Não Observado

CE50 – Concentração de Efeito 50%

C.I. - Color Índex

Cl<sub>2</sub> – Cloro

CL50 – Concentração Letal 50%

cm<sup>2</sup> – Centímetro Quadrado

Conc. - Concentração

COT – Carbono Orgânico Total

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

GHS - Global Harmonization System

h – Hora

H<sub>2</sub>O – Água

KCl – Cloreto de Potássio

Km - Quilômetro

L - Litro

LEAL – Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental “Prof. Abilio Lopes”

M - Molaridade

mg - Miligrama

min - Minuto

mL – Mililitro

mS – Millisiemens

N – Nitrogênio

n - Número Amostral  
N<sup>o</sup> – Número  
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Sulfato de Sódio  
nm - Nanômetro  
O<sub>3</sub> – Ozônio  
OD – Oxigênio Dissolvido  
p.a. – Pro Analyse  
pH – Potencial Hidrogeniônico  
POA - Processo Oxidativo Avançado  
sp. – Espécie  
T - Tempo  
TiO<sub>2</sub> – Dióxido de Titânio  
UV – Ultra-violeta  
V - Volts  
W - Watts  
Zn - Zinco  
ZnSO<sub>4</sub> – Sulfato de Zinco

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>2</b>
2.1 Testes de toxicidade com copépodos marinhos .....	2
2.2 Corantes têxteis .....	5
2.3 Tratamento fotoeletroquímico de corantes .....	9
<b>3. OBJETIVO .....</b>	<b>11</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
4.1 Compostos químicos .....	12
4.2 Testes de toxicidade .....	14
4.2.1 Origem, Manutenção e Monitoramento da sensibilidade da cultura de <i>Nitokra sp.</i> .....	14
4.2.2 Testes de toxicidade - avaliação da imobilidade.....	15
4.2.3 Testes de toxicidade – sucesso de eclosão de ovos.....	16
4.4 Tratamento fotoeletroquímico.....	17
4.5 Gerenciamento dos resíduos gerados .....	18
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>19</b>
5.1 Avaliação da sensibilidade de <i>Nitokra sp.</i> - imobilidade com substância de referência .....	19
5.2 Teste de toxicidade – avaliação da imobilidade.....	20
5.2.1 Disperse Red 1 .....	20
5.2.2 Disperse Red 13 .....	22
5.3 Teste de toxicidade – sucesso de eclosão de ovos .....	26
5.3.1 Substância de referência.....	26

5.3.2 Corantes .....	27
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>32</b>
<b>APÊNDICE A – Resultados com Zinco .....</b>	<b>42</b>
<b>APÊNDICE B – Resultados com Disperse Red 1.....</b>	<b>46</b>
<b>APÊNDICE C – Resultados com Disperse Red 13.....</b>	<b>51</b>



# 1. INTRODUÇÃO

Os corantes, naturais e sintéticos, são usados em exaustão muito antes de se pensar na toxicidade desses compostos. Seu uso, criação e aplicação remetem aos primórdios da sociedade, porém, assim como outros compostos, os corantes, principalmente sintéticos, revelaram seu potencial em causar toxicidade e mutagenicidade. Corantes já foram encontrados em mananciais de água, sua ocorrência no ambiente deve-se primariamente às grandes quantidades perdidas durante o processo de tingimento.

Efluentes provenientes da indústria têxtil, contendo corantes, são foco de muitos estudos para tratamento e degradação dada a elevada complexidade para degradar esses compostos (BERGSTEN-TORRALBA et al., 2009; BAFANA et al., 2011). Os efluentes quando tratados para a remoção da cor e toxicidade, podem tornar-se mais tóxicos dependendo da metodologia empregada.

Os testes mais comumente empregados para a avaliação da toxicidade são com organismos de água doce, notadamente microcrustáceos e algas, mas o emprego de organismos marinhos no caso dos despejos ocorrerem em áreas estuarinas e salinas se faz necessário.

São poucos os trabalhos que utilizaram organismos marinhos na avaliação da toxicidade de corantes (NOVOTNÝ et al., 2006; FERRAZ et al., 2011). O método mais utilizado é com bactéria luminescente (*Vibrio fischeri*), mas testes com outros níveis tróficos são necessários para prover dados visando à derivação de padrões e a proteção da vida aquática em diferentes ambientes.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Testes de toxicidade com copéodos marinhos**

A costa brasileira possui mais de 7000 km de extensão, densa aglomeração urbana, grande diversidade biológica e alta relevância econômica. Porém, sofre com a falta de modelos para avaliar a toxicidade de seus ambientes marinhos. Os principais representantes de ambientes marinhos são os crustáceos, entre eles com grande diversidade destaca-se a subclasse dos copéodos, que compõem o principal elo entre o fitoplâncton e os níveis tróficos superiores (RAISSUDIN et al., 2007). Os copéodos são provavelmente os organismos multicelulares mais numerosos no mundo e há uma estimativa de que apenas 15% das espécies são conhecidas até o momento (MAUCLINE, 1998). Estes organismos estão subdivididos em dez ordens, sendo as mais conhecidas: Harpacticoida, Calanoida e Cyclopoida. Os harpacticóides são predominantemente marinhos e bentônicos, e vivem associados ao sedimento, diferindo das outras ordens em que a maioria das espécies é planctônica.

Copéodos harpacticóides tem representantes de espécies marinhas, de água doce e estuarinas com tolerância a diferentes salinidades, possuem um ciclo de vida aproximado de 3-4 semanas, fazem um importante elo na cadeia alimentar, são abundantes, possuem 12 estágios pós-embrionários distintos (Figura 1), e são sexualmente dimorfos (LOTUFO & ABESSA, 2002; RAISUDDIN et al., 2007). Estudos demonstraram que esses organismos são sensíveis, garantindo seu uso em testes de toxicidade, sendo por vezes mais sensíveis que outros organismos marinhos (BEJARANO et al., 2006; GREENSTEIN et al., 2008; ARAUJO et al., 2009; ARAUJO et al., 2010).

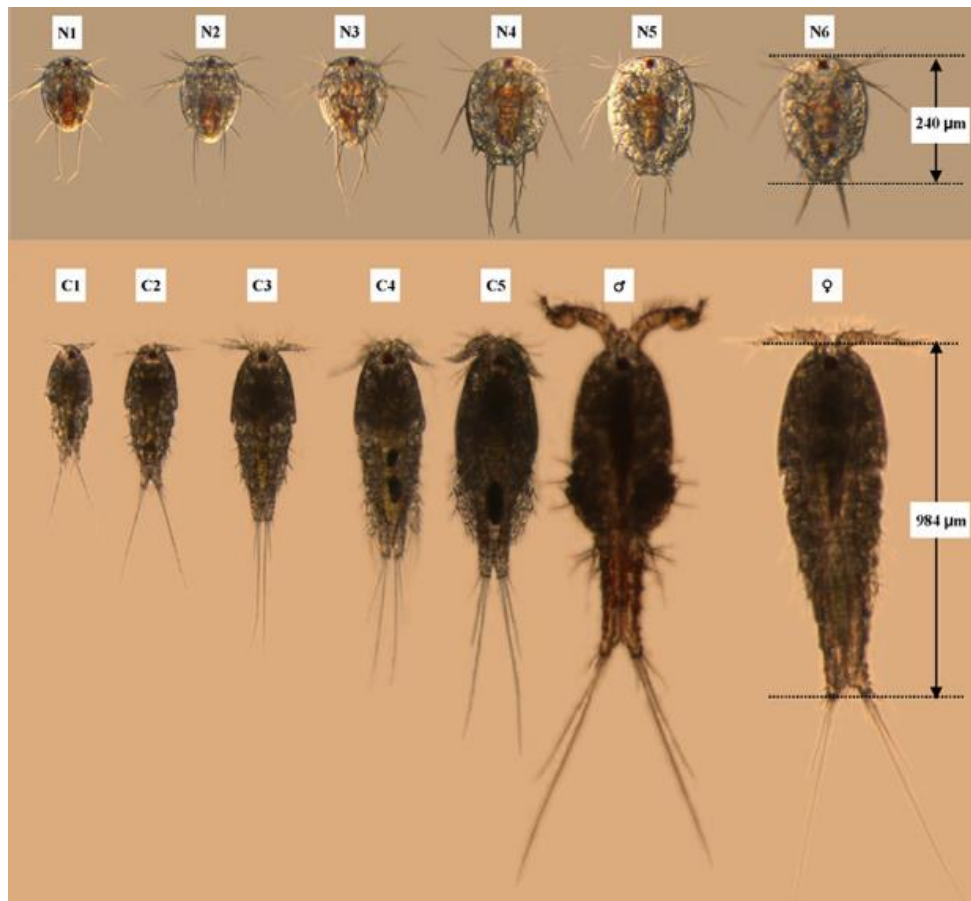


Figura1. Diferentes estágios pós-embrionários do copépodo harpacticóide *Tigriopus japonicus*. N1-N6 estágios de náuplios, C1-C5 estágios de copepoditos, e adultos de copépodos (SEO et al., 2006).

Copépodos tem sido utilizados na avaliação da toxicidade de sedimentos (LOTUFO, 1998; HACK et al., 2008) e poluentes diversos (BEJARANO et al., 2005). Algumas espécies são utilizadas em testes de ciclo de vida, seguindo norma padronizada pela ASTM E 2317 (2004), que avaliam efeitos como sucesso de reprodução e desenvolvimento (KOVATCH et al., 1999; BREITHOLTZ et al., 2003). Buscando *endpoints* mais sensíveis, para garantir não só a sobrevivência, mas também a prosperidade dos organismos, e testes com menor tempo de duração, já existem estudos que buscam etapas mais sensíveis do ciclo de vida do organismo, como testes com embriões (GORBI et al., 2012), testes que avaliam se as substâncias são capazes de comprometer o sucesso de eclosão dos ovos (MIRALTO et al., 2003; NIPPER et al., 2005), ou indução e detecção de biomarcadores de efeito como apoptose em copépodos (BUTTINO et al., 2011a,b).

No Brasil, testes com copépodos já são utilizados para avaliação da toxicidade. O copépodo *Acartia tonsa* foi utilizado para compreender mecanismos de toxicidade de metais como a prata e o cobre (PEDROSO et al. 2007; PINHO & BIANCHINI, 2010). *Tisbe biminiensis* foi citado como um organismo promissor em estudos ecotoxicológicos (ARAUJO-CASTRO et al., 2009).

Ainda no Brasil, foi encontrada uma espécie nativa de *Nitokra sp.*, muito provavelmente uma espécie nova ainda não descrita (Lotufo, comunicação pessoal). *Nitokra sp.* é um copépodo harpacticóide estuarino, coletado na região entre marés de manguezais na região de Cananéia, no litoral sul do Estado de São Paulo (Figura 2) (ZARONI, 2006). Esse organismo é usado em diferentes laboratórios no Brasil e devido o seu habitat estuarino é capaz de viver em uma extensa faixa de salinidade (5 a 30). Lotufo & Abessa (2002) propuseram um método para avaliação de toxicidade com *Nitokra sp.*. ZARONI (2006) utilizou o mesmo copépodo para avaliar a toxicidade dos sedimentos marinhos e estuarinos no município de Bertioga-SP. Souza et al. (2012) avaliaram a sensibilidade de *Nitokra sp.* com dicromato de potássio e amônia, uma carta-controle foi elaborada com dicromato de potássio e a LC(50) média foi de 21,7 mg.L<sup>-1</sup>. Os resultados demonstraram sensibilidade às substâncias testadas e reprodutibilidade nos testes.

Dada as fáceis condições de cultivo, a possibilidade de usar em diferentes salinidades, a sensibilidade relatada em outros trabalhos, *Nitokra sp.* parece uma alternativa promissora para testes de toxicidade com amostras marinhas e estuarinas.

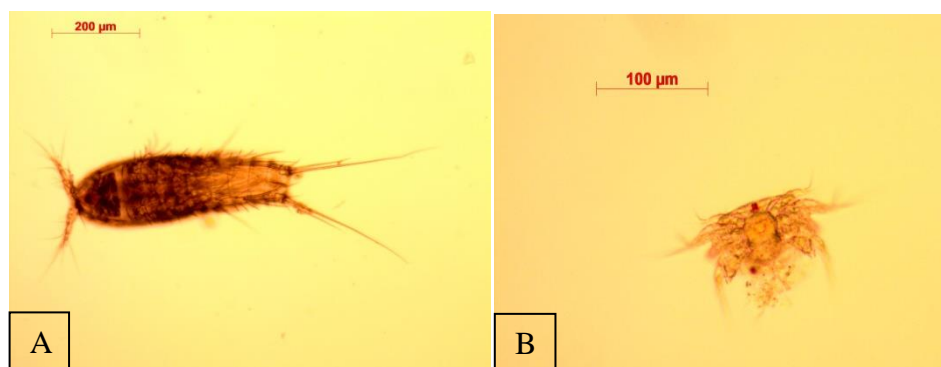


Figura 2. *Nitokra sp.* A- adulto; B- náuplio.

## 2.2 Corantes têxteis

Corantes são compostos orgânicos coloridos que absorvem luz na região do visível e podem se conectar fortemente à fibra em decorrência de ligações químicas e físicas entre o grupo do corante e o grupo da fibra (IQBAL, 2008). Normalmente são utilizados em soluções para fixar e dar coloração aos mais diversos materiais (tecido, cabelo, couro, entre outros). Cor e corante sempre desempenharam um papel fundamental na sociedade, a preparação de cores e tingimento de tecidos remontam à Antiguidade (IQBAL, 2008). Seu uso deu-se inicialmente com os corantes naturais, oriundos de plantas e alguns animais, e aplicados principalmente para a coloração de tecidos. Posteriormente, os corantes sintéticos foram criados e rapidamente difundidos devido à introdução de novas fibras, aplicações e distintos usos, podendo ser encontrados em tintas, produtos cosméticos, alimentos e na medicina (HUNGER, 2002; BAFANA et al., 2011).

Os corantes são classificados de acordo com sua estrutura química ou pelo seu uso e aplicação. Os corantes dispersos são de baixa solubilidade em água e usados predominantemente em fibras hidrofóbicas como o poliéster. Entre eles destacam-se os azo corantes que representam mais da metade dos corantes comerciais e caracterizam-se pela presença de pelo menos um grupamento azo ( $N=N$ ). O sucesso de seu emprego dá-se predominantemente pelo grande número de combinações moleculares que podem ser geradas e pela facilidade do processo em que ele pode ser produzido (HUNGER, 2002).

A aplicação de corantes é predominante na indústria têxtil, uma vez que cada fibra requer produtos com características específicas para dar a coloração (GUARATINI & ZANONI, 1999). Durante esse processo, resíduos de corantes são descartados, e geralmente aqueles de baixa degradabilidade passam pelo tratamento e podem ser encontrados no ambiente (WANG et al., 2002). Alguns corantes foram relacionados a atividades mutagênicas em manancial no Estado de São Paulo (UMBUZEIRO et al., 2005), podendo inclusive impactar a água para consumo humano (ALVES DE LIMA et al., 2007) e lodo de esgoto (UMBUZEIRO et al., 2004).

Uma vez no ambiente esses resíduos podem causar efeitos a diversos organismos, pois corantes são geralmente tóxicos e mutagênicos, tendo sua toxicidade atribuída principalmente aos seus produtos de degradação (BAFANA, 2011). Por isso há uma crescente preocupação com os efeitos que possam ser causados por esses compostos no ambiente e nos organismos representantes daquele sistema.

Alguns estudos foram realizados avaliando efeitos de corantes com diferentes espécies, e estão sintetizados no Quadro 1.

Quadro 1. Espécies aquáticas utilizados para avaliação de corantes

<b>Espécie</b>		<b>Referência</b>
<i>Vibrio fischeri</i>	Bactéria	Wang et al. (2002)
<i>Vibrio fischeri</i>	Bactéria	Gottlieb et al. (2003)
<i>Vibrio fischeri</i>	Bactéria	Wang et al. (2003)
<i>Vibrio fischeri</i>	Bactéria	Novotný et al. (2006)
<i>Vibrio fischeri</i>	Bactéria	Osugi et al. (2006)
<i>Vibrio fischeri</i>	Bactéria	Garcia-Montaña et al. (2008)
<i>Vibrio fischeri</i>	Bactéria	Ferraz et al. (2011)
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Protozoário	Novotný et al. (2006)
<i>Pseudokircheneriella subcapitata</i>	Alga	Novotný et al. (2006)
<i>Chlorella sp.</i>	Alga	Vinitnantharat et al. (2008)
<i>Daphnia pulex</i>	Microcrustáceo	Walthall & Stark (1999)
<i>Daphnia pulex</i>	Microcrustáceo	Bergsten-Torralba et al. (2009)
<i>Daphnia magna</i>	Microcrustáceo	Bae et al. (2006)
<i>Daphnia magna</i>	Microcrustáceo	Bae & Freeman (2007a,b)
<i>Daphnia magna</i>	Microcrustáceo	Liu et al. (2007)
<i>Daphnia magna</i>	Microcrustáceo	Verma (2008)
<i>Daphnia magna</i>	Microcrustáceo	Immich et al. (2009)
<i>Daphnia magna</i>	Microcrustáceo	Silva et al. (2012)
<i>Daphnia similis</i>	Microcrustáceo	Ferraz et al. (2010)
<i>Daphnia similis</i>	Microcrustáceo	Ferraz et al. (2011)
<i>Daphnia similis</i>	Microcrustáceo	Vacchi et al. (2013)
<i>Moina macrocopa</i>	Microcrustáceo	Wong et al. (2006)
<i>Moina macrocopa</i>	Microcrustáceo	Vinitnantharat et al. (2008)
<i>Artemia salina</i>	Microcrustáceo	Ayed et al. (2011)
<i>Xenopus laevis</i>	Sapo (larva)	Birhanli & Ozmen (2005)
<i>Hydra attenuata</i>	Cnidário	Vacchi et al. (2013)
<i>Brachydanio rerio</i>	Peixe	Liu et al. (2007)
<i>Carassius auratus</i>	Peixe	Liu et al. (2007)

A utilização do teste com bactérias e microcrustáceos é predominante, sendo o *Vibrio fischeri* e a *Artemia salina* os únicos representantes de ambientes aquáticos utilizados para a avaliação da toxicidade de amostras marinhas de corantes na literatura pesquisada.

Entre os estudos citados destaca-se a elevada toxicidade dos corantes azóicos Disperse Red 1 e Disperse Red 13 avaliados por Ferraz et al. (2010) em que a CE50(48h) para *Daphnia similis* foi de 0,12 mg.L<sup>-1</sup> e 0,01 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, resultado classificado como muito tóxico para a vida aquática, segundo o Global Harmonization System (GHS) (GHS, 2005).

Os corante Disperse Red 1 e Disperse Red 13 além de serem bastante tóxicos para organismos aquáticos demonstraram ser mutagênicos no teste de *Salmonella*/microsoma (FERRAZ et al., 2010). Esse mesmo potencial foi relatado com os produtos formados após processos de oxidação e redução do Disperse Red 1, simulando uma biotransformação hepática (CHEQUER et al., 2011). Oliveira et al. (2010) avaliaram a eficiência de um processo de cloração convencional para remover a mutagenicidade do Disperse Red 1 e verificaram que o tratamento não foi eficiente. Porém, o tratamento fotoeletrocatalítico, com o mesmo corante, foi capaz de remover a atividade mutagênica, sendo um tratamento promissor para azo corantes (OSUGI et al., 2009).

Os corantes comerciais, como comumente são comercializados para emprego na indústria, são produtos com diferentes formulações e normalmente possuem agentes dispersantes e outros corantes provenientes da síntese. Vacchi et al. (2013) caracterizaram e testaram os diferentes componentes do corante Disperse Red 1 em sua forma comercial e verificaram, após testar o agente dispersante e os outros componentes do produto, que a toxicidade era causada pelo corante principal, o Disperse Red 1, pelo menos para *D. similis*. Esse mesmo produto comercial foi clorado, mimetizando um processo convencional de tratamento de água residuárias, e o produto formado apesar de menos tóxico para *D. similis*, foi mais tóxico para *Hydra attenuata* e mais mutagênico no teste de *Salmonella*/microsoma.

A avaliação da toxicidade dos corantes é um dos passos para promover a proteção da vida aquática. E quanto maior e mais consistentes forem os dados disponíveis mais fácil a tomada de medidas de controle e prevenção. Vacchi (2012) utilizou vários testes e organismos, de diferentes níveis tróficos, para avaliar a toxicidade do corante comercial Disperse Red 1 (Quadro 2). Devido às diferenças de sensibilidade entre os organismos e, os *endpoints* avaliados a toxicidade variou bastante sendo a alga (*Pseudokirchneriella subcapitata*) e os microcrustáceos (*D. similis* e *C.*

*dubia*) os organismos mais sensíveis para esse composto. Não foram encontrados na literatura estudos que utilizaram organismos marinhos na avaliação da toxicidade dos corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13.

Quadro 2. Toxicidade do corante comercial Disperse Red 1 à diferentes espécies aquáticas (VACCHI, 2012; VACCHI et al., 2012)

<b>Espécie</b>	<b>Endpoint</b>	<b>Tempo de exposição</b>	<b>Resultado (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	inibição do crescimento - CENO	72 h	0,10
<i>Daphnia similis</i>	letalidade - CL50	48 h	0,13
<i>Daphnia magna</i>	letalidade - CL50	48 h	0,58
<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	letalidade - CL50	48 h	0,78
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	letalidade - CL50	48 h	0,48
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	inibição da reprodução - CENO	8 d	0,10
<i>Danio rerio</i>	Larva - letalidade - CL50	96h	>50
	Adulto - CL50	96h	>100
<i>Girardia tigrina</i>	Jovem - letalidade - CL50	96h	79
	Adulto - CL50	96h	154
<i>Hydra attenuata</i>	inibição da reprodução - CENO	7 d	1,0
	Agudo letalidade - CL50	96 h	48



## 2.3 Tratamento fotoeletroquímico de corantes

A indústria têxtil é uma das maiores geradoras de efluentes e não só os grandes volumes preocupam do ponto de vista ambiental. Os efluentes gerados, principalmente durante o processo de tingimento, caracterizam-se por altos valores de carbono orgânico total (COT), baixa demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sólidos suspensos, salinidade, coloração, variações de pH e a presença de compostos recalcitrantes como os azo corantes (SOLÍS et al., 2012).

Essas características além de causar danos ao ambiente tornam o tratamento desses efluentes um desafio. Muitos são os métodos conhecidos e aplicados para o tratamento desses efluentes: biodegradação, degradação química ( $O_3$  ou  $Cl_2$ ) e métodos físicos, como a filtração (CATANHO et al., 2006a). Esses processos normalmente envolvem a produção de grandes quantidades de resíduos sólidos, necessitam de grandes áreas, rígido controle e alto custo. Ou ainda, são capazes de produzir compostos mais perigosos, como é o caso de produtos de desinfecção com cloro, e por isso devem ser evitados (OSUGI et al., 2009; VACCHI et al., 2013).

Atualmente os tratamentos baseados nos processos oxidativos avançados (POA) tem obtido sucesso e são apontados como alternativas promissoras no tratamento de compostos orgânicos. O processo para degradar contaminantes orgânicos tem como objetivo a geração da hidroxila radicalar, espécie não seletiva e altamente oxidante que é capaz de promover a mineralização de substâncias orgânicas. Esse radical tem um potencial oxidativo maior do que alguns fortes oxidantes como ozônio, peróxido de hidrogênio e cloro (COSTA, 2009).

Entre os processos oxidativos avançados o tratamento fotoeletroquímico tem sido apontado como uma opção para o tratamento de corantes (OSUGI et al., 2006). Esse tratamento consiste na utilização de um substrato foto sensível (semicondutor) empregado como catalisador, que quando submetido à radiação UV com um comprimento de onda adequado para superar sua energia de *bandgap* (energia necessária para que o elétron passe da banda de valência para a banda de condução) formando um par elétron/lacuna através da promoção de um elétron da banda de valência para a banda de condução. Essas lacunas podem oxidar as moléculas de água adsorvidas no semicondutor ou oxidar diretamente os contaminantes orgânicos por transferência de carga (CATANHO et al., 2006b; COSTA, 2009).

Catanho et al. (2006b) tratou três diferentes corantes remazol e mostrou que o tratamento fotoeletroquímico foi capaz de remover a coloração em 90 minutos. Osugi et al. (2006) removeu 100% da coloração do corante Remazol Turquoise Blue 15 com 3 horas de tratamento, mas ao final deste houve um aumento na toxicidade para o *Vibrio fischeri*.

Os corantes dispersos Orange 1, Red 1 e Red 13 foram tratados por processo fotoeletroquímico e com 1 hora de tratamento obteve-se total descoloração e completa redução da atividade mutagênica (OSUGI et al., 2009).

Embora o tratamento fotoeletroquímico esteja em evidência e está sendo apontado como um tratamento promissor para compostos recalcitrantes pouco é sabido sobre a toxicidade dos produtos formados durante o tratamento (OSUGI et al., 2006). Como na realização deste tratamento é indispensável à utilização de sais, geralmente NaCl e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, como eletrólitos de suporte para garantir a eficiência do tratamento (OLIVEIRA, 2008), a utilização de organismos marinhos é uma opção ideal para avaliações posteriores a esses tratamentos. A adição de sais nesses efluentes, se descartados em ambientes de água doce, podem causar toxicidade para os organismos representantes desses ambientes.

### **3. OBJETIVO**

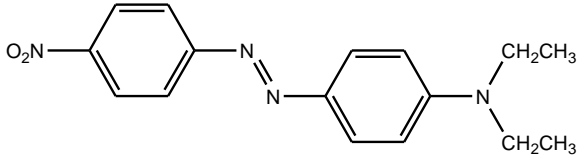
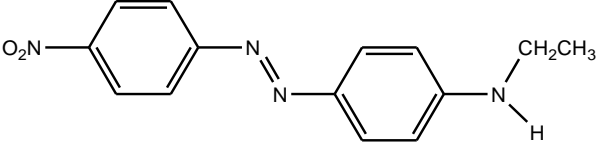
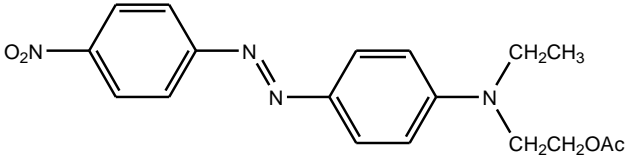
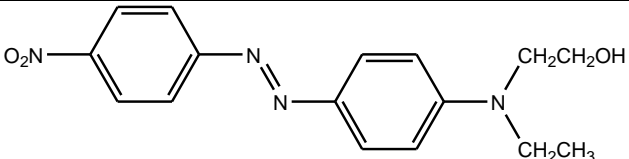
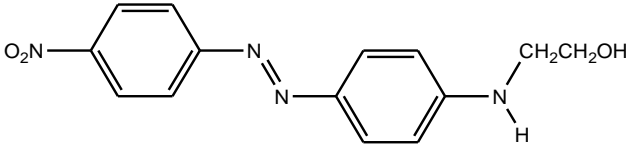
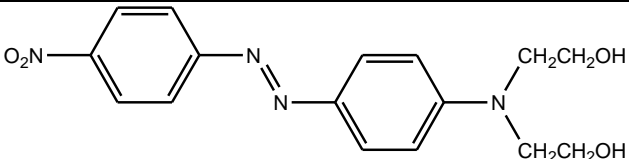
Avaliação da toxicidade dos azo corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 antes e após tratamento fotoeletroquímico através de testes de toxicidade com o copépodo marinho *Nitokra sp.* utilizando como *endpoint* a imobilidade de organismos adultos e o sucesso de eclosão dos ovos.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Compostos químicos**

O corante comercial Disperse Red 1 foi adquirido da empresa PCIL® – Produtos Químicos para Indústrias LTDA e tem como produto principal o corante CI Disperse Red 1 (*N*-Ethyl-*N* (2-hydroxyethyl)-4-(4-nitrophenylazo) aniline; CAS number 2872- 52-8. O produto comercial foi caracterizado por Vacchi et al. (2013), contém 61% do corante principal, 20% de surfactante, provavelmente lignina, e o restante são resíduos de síntese do corante (Tabela 1) (VACCHI et al., 2013).

Tabela 1. Componentes do corante comercial Disperse Red 1 (VACCHI et al., 2013)

Composto	Fórmula estrutural	Porcentagem em massa em relação aos 80% de corante no produto
1		5
2		3
3		5
4		61
6		4
8		2

Vacchi et al. (2013) concluíram que a fração principal, representada pelo corante Disperse Red 1, foi a maior contribuinte do produto comercial para a toxicidade de organismos aquáticos.

O corante Disperse Red 13 foi adquirido da Sigma Aldrich® (produto padrão- pureza de 25%) cuja fórmula é 2-[4-(2-Chloro-4-nitrophenylazo)-N-ethylphenylamino]ethanol; CAS

number 3180-81-2 (Figura 3). O Disperse Red 13 difere do Disperse Red 1 por possuir um átomo de cloro na sua estrutura.

O preparo das soluções estoque dos corantes foi realizado em água ultrapura (Milli-Q Academic Millipore™, Billerica, MA, USA) e, posteriormente foi diluída em água salina, de modo que não afetasse a salinidade das amostras, não ultrapassando 10% do volume da solução teste na maior concentração.

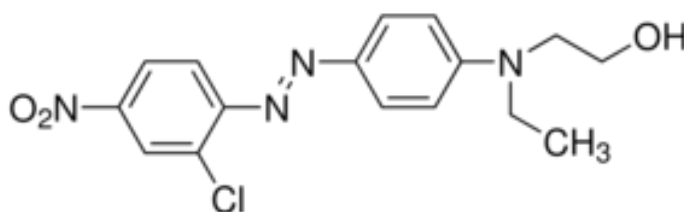


Figura 3. Estrutura química do Disperse Red 13.

## 4.2 Testes de toxicidade

### 4.2.1 Origem, Manutenção e Monitoramento da sensibilidade da cultura de *Nitokra* sp.

Os organismos foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Eduinetty Ceci P. M. de Sousa do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo em 2009, e desde então são cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental “Prof. Abílio Lopes” - LEAL.

Os organismos foram cultivados de acordo com o método proposto por Lotufo & Abessa (2002) com pequenas modificações. Os organismos foram mantidos em temperatura constante de  $24 \pm 1$  °C e fotoperíodo de 12h claro: 12h escuro, cultivados em erlenmeyers de 500 e 1000 mL tampados com gaze e algodão, alimentados com ração de peixe TETRAMIN® fermentada (ABNT, 2004) duas vezes por semana. Os copépodos foram cultivados em diferentes salinidades (5, 10 e 20) em água do mar reconstituída (Red Sea Salt Coral Pro®) e trocas parciais de água foram realizadas periodicamente.

O sulfato de zinco P.A (ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O - Ecibra®) foi utilizado como substância de referência nos testes de imobilidade e sucesso de eclosão. As soluções foram preparadas com

água salina reconstituída - água deionizada e sal marinho (Red Sea Salt Coral Pro®). A salinidade escolhida para os testes foi de 20, água salobra que fica mais próxima às condições de estuário.

Os testes foram realizados conforme Lotufo & Abessa (2002), com algumas modificações. Copépodos adultos foram expostos às diferentes concentrações da substância de referência, em triplicata, 10 organismos e 5 mL por réplica, por 96 h em condições estáticas, em microplacas multiescavadas. A imobilidade dos organismos foi registrada ao final do teste e a concentração efetiva 50 (CE50) foi calculada através do método de Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977).

#### **4.2.2 Testes de toxicidade - avaliação da imobilidade**

A dispersão da solução estoque sempre em água ultrapura (Milli-Q Academic Millipore™, Billerica, MA, USA) e as concentrações utilizadas no teste foram diluídas posteriormente em água salina, na salinidade adequada para os organismos, de modo que a diluição não alterasse a salinidade da água. Como o organismo utilizado neste estudo tolera e é cultivado em diferentes salinidades, optou-se por realizar testes de toxicidade em salinidade 20, característica de ambientes estuarinos.

As condições do teste estão descritas na Tabela 2. O teste tem como *endpoint* a imobilidade dos organismos, que é verificada ao final do teste com o auxílio de um microscópio estereoscópico e a CE50(96h) é calculada através do programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977). Os testes foram considerados válidos quando não houve imobilidade superior a 10% no controle.

Tabela 2. Resumo das condições utilizadas no teste de imobilidade com *Nitokra sp.*

<b>Parâmetro</b>	<b>Condição empregada</b>
<b>Volume de amostra</b>	5 mL por réplica
<b>Nº organismos</b>	10 organismos por replica
<b>Temperatura</b>	24±1 °C
<b>Tempo de exposição</b>	96 h
<b>Fotoperíodo</b>	12-12h
<b>Idade organismos</b>	Adultos
<b>Réplicas</b>	No mínimo 3
<b>Endpoint</b>	Imobilidade
<b>Tipo de teste</b>	Estático

#### 4.2.3 Testes de toxicidade – sucesso de eclosão de ovos

Os testes de sucesso de eclosão de ovos foram realizados baseados em Lotufo & Abessa (2002) e Nipper et al. (2005). As soluções preparadas para o teste foram feitas em água ultrapura, e depois realizadas sucessivas diluições em água salina, de modo que não alterasse a salinidade das amostras. Os testes foram realizados com 2 mL de solução em placas multiescavadas (24 poços), dez réplicas, uma fêmea ovada por réplica, o período de exposição foi de 96 horas, temperatura de 24°C ± 1 e foto período de 12h luz-12h escuro. As condições do teste estão descritas na Tabela 3.

O teste teve como *endpoints* a sobrevivência de fêmeas adultas e o sucesso de eclosão de ovos. Ao final do teste o número de fêmeas sobreviventes e o número de náuplios nascidos por réplica foram registrados com ajuda de um microscópio estereoscópico. Os dados de sobrevivência das fêmeas foram analisados com o programa Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977) e calculada a CE50(96h).

Os resultados dos testes de eclosão foram analisados pelo programa InStat versão 3.0 que comparou o nascimento de náuplios das fêmeas de *Nitokra sp.* entre o controle e as concentrações, através dos métodos ANOVA e pós-teste de Dunnett (p<0,05). Os resultados foram expressos em concentração de efeito observado (CEO) e foram considerados válidos quando não houve imobilidade superior a 10% no controle.



Tabela 3. Resumo das condições utilizadas no teste de sucesso de eclosão com *Nitokra sp.*

<b>Parâmetro</b>	<b>Condição empregada</b>
<b>Volume de amostra</b>	2 mL
<b>Nº organismos</b>	1 por réplica
<b>Temperatura</b>	24 ±1 °C
<b>Tempo de exposição</b>	96h
<b>Fotoperíodo</b>	12-12h
<b>Idade organismos</b>	Fêmeas ovadas
<b>Nº de réplicas</b>	10
<b>Endpoint</b>	Imobilidade e sucesso de eclosão
<b>Tipo de teste</b>	Estático

#### 4.4 Tratamento fotoeletroquímico

O tratamento fotoeletroquímico foi realizado no Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Araraquara, sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni.

O tratamento foi realizado em um reator de 250 mL equipado com água refrigerada usando um banho ultra-termostático (Nova Técnica, Brasil) (Figura 4). Na célula foi colocado um eletrodo de trabalho composto por matrizes de nanotubos de titânio auto-organizados. Utilizou-se Ag/AgCl KCl 3M como eletrodo de referência, uma placa de titânio revestida com uma camada de cloreto de rutênio como eletrodo auxiliar e como eletrólito foi utilizado Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-0,1M. A área foto-ativa do eletrodo (TiO<sub>2</sub>) era 25 cm<sup>2</sup> e foi iluminado com uma fonte de radiação UV de 125 W.

As soluções tinham concentração inicial de 20 mg.L<sup>-1</sup> e foram acidificadas em meio de ácido sulfúrico para o pH=2. A solução foi colocada no reator e o processo deu-se com a utilização de um agitador magnético posicionado sob o reator. A corrente utilizada foi de 1,0 V e o tempo de tratamento foi de 2 horas em um potenciostato/galvanostato (modelo PAR 263).

A concentração do corante na solução foi monitorada pelas medidas de absorvância de amostras em tempos controlados usando o Espectrofotômetro Hewlett Packard 8453.

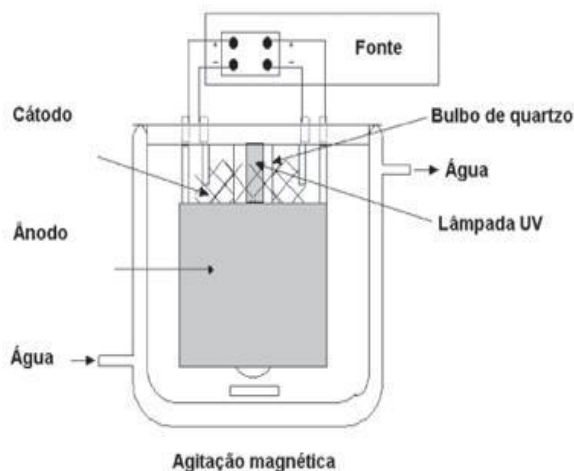


Figura 4. Esquema do reator fotoeletroquímico utilizado nos tratamentos dos corantes (Adaptado de LUCAS et al., 2008).

## 4.5 Gerenciamento dos resíduos gerados

Os resíduos gerados durante o preparo das soluções e dos testes de toxicidade foram armazenados em local apropriado e serão encaminhados para destinação adequada na UNICAMP.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação da sensibilidade de *Nitokra sp.* - imobilidade com substância de referência

Periodicamente, foram realizados testes de imobilidade com substância de referência desde 2010 para acompanhamento da sensibilidade da cultura de *Nitokra sp.*. Uma carta-controlé foi elaborada com os resultados obtidos (Figura 5). A média foi apresentada na parte central do gráfico e os limites superiores e inferiores foram apresentados pela linha tracejada e representam duas vezes o desvio padrão (BURTON et al., 2009). A média da CE50(96h) é de 0,64 mg.L<sup>-1</sup> de Zn<sup>+2</sup> (n=19). Como pode ser observado não houve resultados acima ou abaixo de dois desvios, indicando que a sensibilidade da cultura se manteve estável durante o período. Os dados podem ser encontrados no Apêndice A.

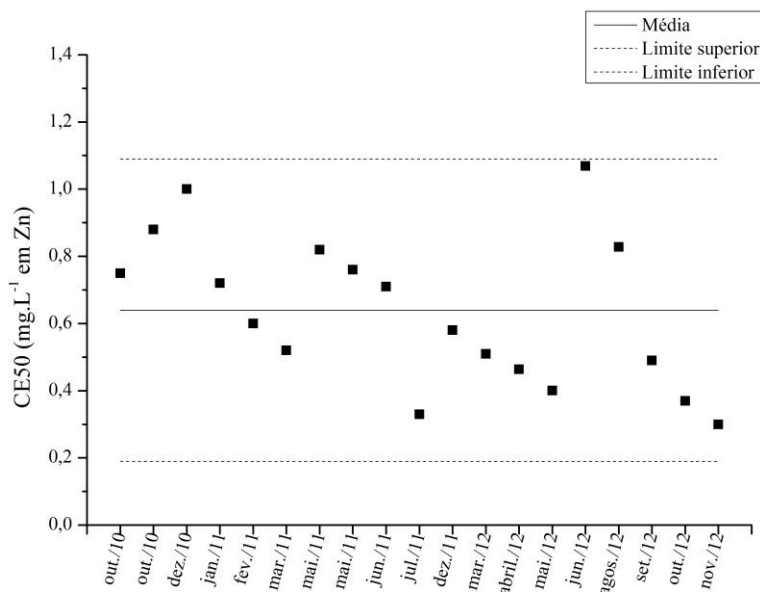


Figura 5. Carta-controlé do *Nitokra sp.* CE50(96h), resultados expressos em Zn. Média representada pela linha contínua e limites superiores e inferiores a dois desvios padrões pela linha tracejada.

## 5.2 Teste de toxicidade – avaliação da imobilidade

### 5.2.1 Disperse Red 1

Testes preliminares com o corante Disperse Red 1 demonstraram que a dispersão do corante em água salina era baixa. Algumas tentativas de dispersão com ultrassom e a utilização de diferentes salinidades foram realizadas, mas o resultado também não foi satisfatório. Optou-se por preparar a dispersão da solução estoque em água ultrapura (MilliQ®) e as diluições sucessivas em água salina, sendo que a solução estoque não ultrapassou 10% do volume na solução teste mais alta. Portanto, todos os testes com corante foram realizados nessa condição.

Com o corante Disperse Red 1 foram realizados quatro testes de toxicidade para determinar a CE50, esses resultados estão apresentados na Tabela 4. Os dados brutos podem ser encontrados no APÊNDICE B.

Tabela 4. Valores de CE50 e intervalos de confiança obtidos nos testes de imobilidade com *Nitokra sp.* exposto ao corante Disperse Red 1

Teste	CE50 (mg.L <sup>-1</sup> )
1	0,92 (0,24-3,54)
2	0,30 (0,20-0,40)
3	2,07 (1,61-2,67)
4	1,18 (0,64-2,18)

Mesmo utilizando a água ultrapura para o preparo da solução estoque, era possível observar ao final do teste (após 96h), corante precipitado no fundo do recipiente. Sugere-se que as variações dos resultados nos testes de toxicidade são oriundas dessas diferenças na dispersão do corante, além das diferenças intrínsecas a sensibilidade do organismo. Desta forma podemos apenas reportar a faixa de CE50 para esse corante como sendo de 0,3 a 2,1 mg.L<sup>-1</sup>.

Após a realização do tratamento fotoeletroquímico por duas horas houve redução na coloração confirmada pela redução da absorvância (Figura 6). Devido ao baixo pH usado no tratamento a amostra ao final deste ainda apresentava um pH=4, determinado pelo método papel indicador (Merck®). Optou-se por não proceder a correção do pH para realização dos testes para

não interferir nas condições físico químicas da amostra tratada, pois houve preliminarmente uma tentativa de correção do pH que modificou a coloração e aspecto da amostra. Desta forma testou-se concentrações máximas onde o pH se encontrava dentro da faixa aceitável para o teste, a qual foi de  $2 \text{ mg.L}^{-1}$ . Os parâmetros pH, salinidade, oxigênio dissolvido (O.D.) e condutividade foram registrados ao final do teste, esses resultados podem ser encontrados no APÊNDICE B.

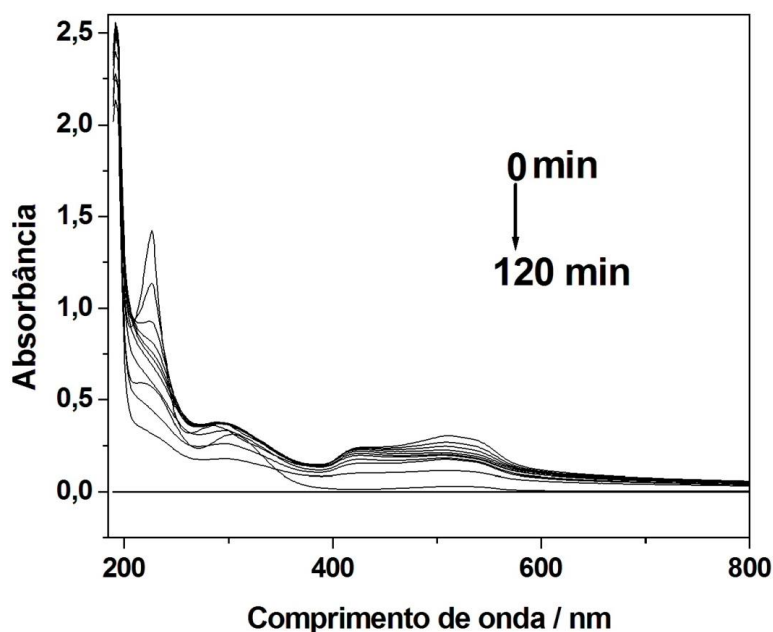


Figura 6. Monitoramento da absorvância do corante Disperse Red 1 ( $20 \text{ mg.L}^{-1}$ ) durante o tratamento fotoeletroquímico.

Para verificar se houve redução da toxicidade do corante após o tratamento realizou-se o teste de imobilidade com *Nitokra sp.* novamente. A CE50 no teste não pode ser determinada, mas pode-se observar que é maior que a máxima concentração possível de ser testada ( $2 \text{ mg.L}^{-1}$ ), devido a interferência do pH já reportada acima. Os dados dos quatro testes de toxicidade com o Disperse Red 1 em comparação com a amostra tratada fotoeletroquimicamente foram apresentados na Figura 7. Para fins comparativos o resultado da amostra tratada foi expressa em  $\text{mg.L}^{-1}$  equivalente ao corante inicialmente tratado.

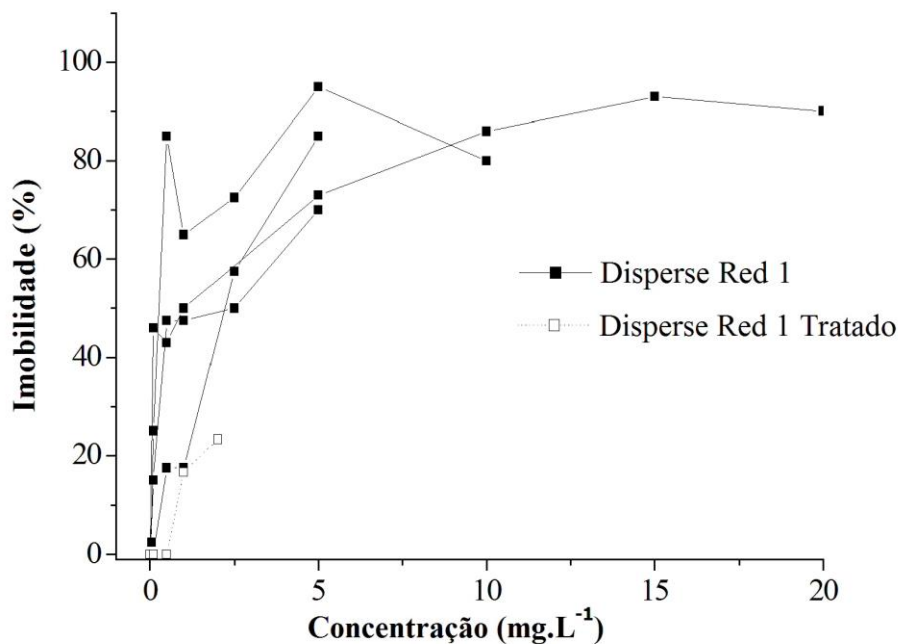


Figura 7. Curva dose-resposta do *Nitokra sp.* exposto ao corante Disperse Red 1 e a amostra do tratamento fotoeletroquímico. Neste caso as concentrações foram expressas em mg equivalente de corante tratado por litro.

Pode-se observar que houve redução da cor da solução de corante após o tratamento e os dados sugerem uma redução na toxicidade, indicando que o tratamento fotoeletroquímico é promissor. Os produtos gerados durante o processo de tratamento estão ainda em fase de identificação por espectrometria de massas. Para viabilizar uma melhor avaliação da toxicidade da amostra tratada, tratamentos com uma concentração de corante inicial mais elevada seriam recomendados ou modificações nas condições do tratamento de forma a gerar amostras com pH compatível com os testes.

### 5.2.2 Disperse Red 13

As soluções para o teste com o Disperse Red 13 p.a. foram preparadas da mesma maneira realizada com o Disperse Red 1 (ver item 5.2.1), a solução estoque em água ultrapura e as demais concentrações em água salina. Para a determinação da CE50 do corante Disperse Red 13 foram

realizados dois testes de toxicidade. Ao final dos testes com esse corante, visualmente observou-se menor precipitação do corante e menor variação em comparação com o Disperse Red 1 ao final do teste. As CE50(96h) obtidas nos testes foram de 1,54 (1,23-1,92) e 1,44 (1,25-1,66) mg.L<sup>-1</sup>. Como pode ser observado a CE50 obtida nos testes foram bastante similares. Desta forma, optou-se por utilizar a média dos valores para indicar a CE50 do Disperse Red 13 p.a., ou seja, 1,5 mg.L<sup>-1</sup> (n=2). Os dados brutos podem ser encontrados no Apêndice C.

Ferraz et al. (2010) testaram os corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 e verificaram que por possuir um átomo de cloro na sua estrutura, o Red 13 foi menos mutagênico no teste de Ames, porém mais tóxico no teste de toxicidade com *D. similis* do que o Disperse Red 1. Essa comparação não será realizada nesse trabalho em decorrência dos diferentes produtos utilizados (produto comercial e produto Sigma).

Após 2h de tratamento fotoeletroquímico do corante Disperse Red 13, também foi possível observar a redução da absorbância da amostra (Figura 8). Devido ao baixo pH usado no tratamento a amostra ao final ainda apresentou um pH=5 determinado pelo método do papel indicador (Merck®), incompatível com a realização dos testes de toxicidade. Neste trabalho, optou-se por não realizar a correção do pH para realização dos testes para não interferir nas características físico químicas da amostra (ver item 5.2.1). Os parâmetros pH, salinidade, oxigênio dissolvido (O.D.) e condutividade foram registrados ao final do teste e podem ser encontrados no APÊNDICE C.

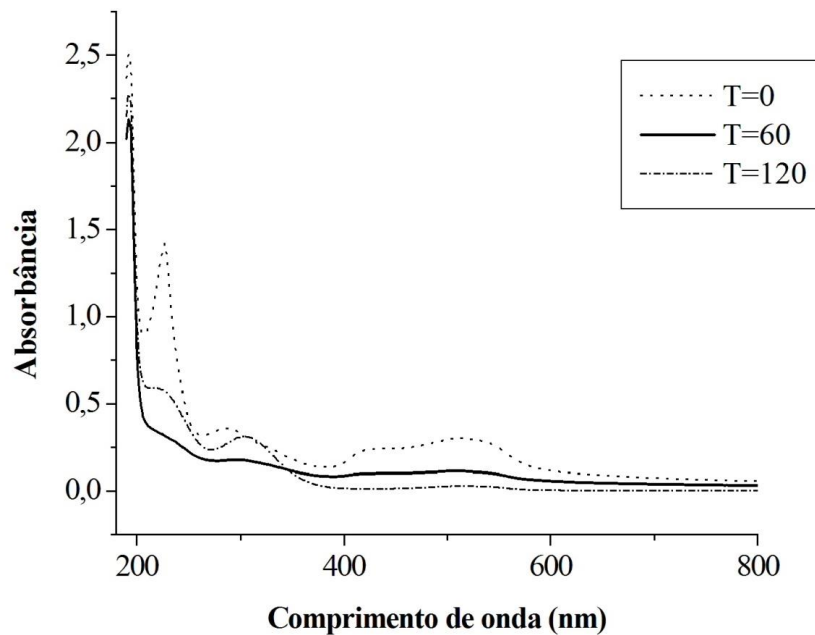


Figura 8. Monitoramento da absorbância durante o tratamento fotoeletroquímico do Disperse Red 13 durante os tempos 0, 60 e 120 min de tratamento.

A amostra gerada no tratamento do corante Disperse Red 13 não apresentou efeito até a maior concentração testada de  $2 \text{ mg.L}^{-1}$ , em decorrência do baixo pH ao final do tratamento, como já discutido para o Disperse Red 1 (ver item 5.2.1). Os resultados do teste com o Disperse Red 13 tratado e não tratado estão ilustrados na Figura 9.



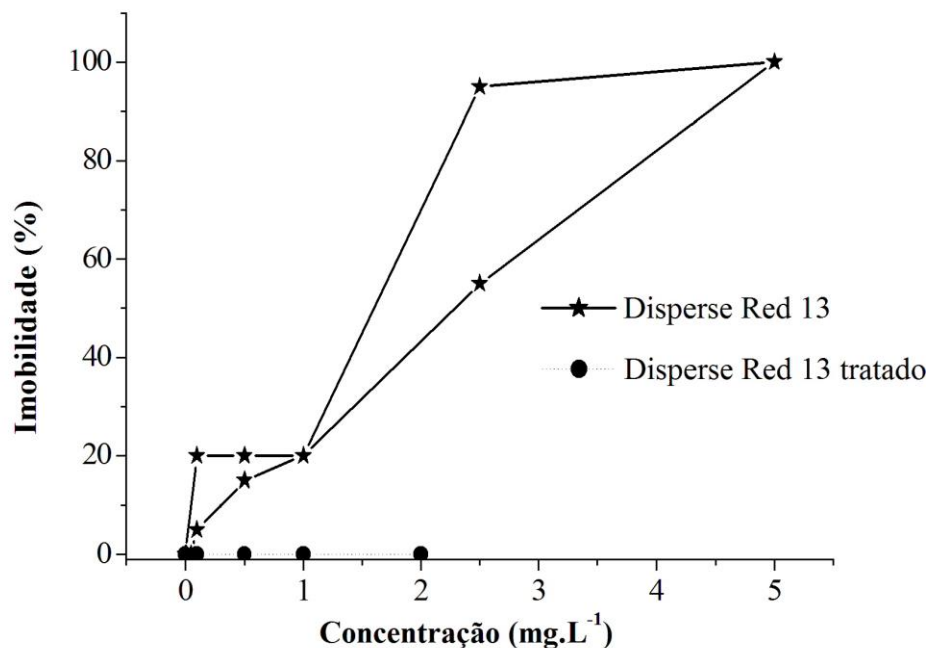


Figura 9. Curva dose-resposta do *Nitokra sp.* exposto ao corante Disperse Red 13 p.a. e a amostra do tratamento fotoeletroquímico. Neste caso as concentrações foram expressas em mg equivalente de corante tratado por litro.

Pode-se observar que também houve redução na cor da solução de corante Disperse Red 13 após o tratamento e o resultado do teste sugere a redução da toxicidade. Os produtos gerados durante o processo fotoeletroquímico estão ainda em fase de identificação. Para uma melhor avaliação da toxicidade da amostra tratada seria recomendado algumas modificações no tratamento aplicado, como uma concentração inicial de corante mais elevada, ou uma faixa de pH mais adequada aos testes de toxicidade.

### 5.3 Teste de toxicidade – sucesso de eclosão de ovos

#### 5.3.1 Substância de referência

As concentrações para realização deste teste foram escolhidas com base nos testes de imobilidade. O teste foi realizado com sulfato de zinco como substância de referência e estão apresentados na tabela 5. Os dados brutos podem ser encontrados no APÊNDICE A.

Tabela 5. Resultados dos testes de eclosão realizados com *Nitokra sp.* após exposição a zinco expresso em CEO (concentração de efeito observado) para o *endpoint* eclosão de ovos em comparação com a CE50 das fêmeas imóveis

Teste	CE50 fêmeas (mg.L <sup>-1</sup> Zn)	CEO (mg.L <sup>-1</sup> Zn)
1	>0,11	0,11
2	>0,23	>0,23
3	0,96 (0,89-1,02)	>2,3
4	0,61	1,14
5	0,39	0,45

Esperava-se de acordo com a literatura (Nipper et al., 2005) que o teste em que o efeito é o sucesso de eclosão dos ovos fosse mais sensível que o efeito de imobilidade em adultos. No entanto, os resultados mostram que isso só aconteceu no primeiro teste realizado em que a concentração de efeito observado foi menor que no teste de imobilidade. Os quatros testes seguintes mostraram valores de efeito na imobilidade (CE50) para as fêmeas inferiores aos valores de efeito no sucesso de eclosão dos ovos. Sugerindo que o *endpoint* de imobilidade com as fêmeas adultas é mais sensível que o efeito de sucesso de eclosão.

Se compararmos os valores da CE50 das fêmeas com os valores já apresentados na carta-controlle (ver Figura 5), esses valores estão dentro da faixa de sensibilidade para adultos. Ou seja, as fêmeas usadas no teste de sucesso de eclosão, ao final do processo reprodutivo, apresentam a mesma sensibilidade ao sulfato de zinco que organismos adultos aleatórios utilizados nos testes de sensibilidade.

### 5.3.2 Corantes

As soluções estoque para estes testes também foram realizadas em água ultrapura, e as diluições em água salina reconstituída (salinidade 20) (de acordo com o item 5.2.1). Os resultados para o teste de eclosão com fêmeas ovadas para o corante Disperse Red 1 foram apresentados na Tabela 6 e para o Disperse Red 13 na Tabela 7 e os dados brutos podem ser encontrados no APÊNDICE B e C.

Tabela 6. Resultados dos testes de sucesso de eclosão realizados com *Nitokra sp.* exposto ao corante Disperse Red 1 com *endpoint* de sucesso de eclosão e CE50 das fêmeas imóveis

Teste	CE50 fêmeas (mg.L <sup>-1</sup> )	CEO (mg.L <sup>-1</sup> )
1	0,29 (0,07-1,15)	>0,5
2	>1	>1
3	>5	1

Tabela 7. Resultados dos testes de sucesso de eclosão realizados com *Nitokra sp.* exposto ao corante Disperse Red 13 com *endpoint* de sucesso de eclosão e CE50 das fêmeas imóveis

Teste	CE50 fêmeas (mg.L <sup>-1</sup> )	CEO (mg.L <sup>-1</sup> )
1	>1	>1
2	1,73 (0,97-3,1)	2

O resultado para os corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 corroboram com a discussão já apresentada em que os resultados, em geral, são muito similares para os efeitos observados ou o teste de imobilidade demonstra-se mais sensível que o sucesso de eclosão dos ovos. Os resultados da CE50 para as fêmeas expostas aos corantes também está similar aos valores apresentada para os corantes com organismos adultos escolhidos aleatoriamente no cultivo (ver Tabela 4).

Os produtos gerados após tratamento fotoeletroquímico dos corantes dispersos Red 1 e Red 13 foram também utilizados no teste de sucesso de eclosão dos ovos até as concentrações em que o pH final da amostra não causasse interferência no teste. Os resultados foram expressos em

mg.L<sup>-1</sup> do corante inicial e estão expressos na Tabela 8. Os dados brutos podem ser encontrados no Apêndice B e C.

Tabela 8. Resultados dos testes de sucesso de eclosão realizados com *Nitokra sp.* exposto aos produtos gerados do tratamento fotoeletroquímico realizado com os corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 com *endpoint* de sucesso de eclosão e CE50 das fêmeas imóveis

<b>Produto</b>	<b>CE50 fêmeas (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>CEO (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
Disperse Red 1	>2	>2
Disperse Red 13	>5	>5

Os resultados dos testes realizados com os corantes antes e após tratamento fotoeletroquímico foram compilados na Tabela 9. Observa-se que os resultados do teste de sucesso de eclosão são similares ou menos sensíveis que os resultados do teste de imobilidade com adultos, incluindo a imobilidade das fêmeas em período reprodutivo, pois se obteve resultados similares aos adultos escolhidos aleatoriamente. Sugere-se que o córion quitinoso que só é permeável para moléculas muito pequenas, que envolvem esses embriões (ZIRBEL et al., 2007), explique a baixa sensibilidade desse *endpoint*, impedindo a entrada dessas substâncias.

Tabela 9. Resumo dos resultados da exposição do *Nitokra sp.* aos corantes Disperse Red 1 e Disperse Red 13 antes e após tratamento fotoeletroquímico

Substância	Endpoint	CE50 (mg.L <sup>-1</sup> )	CEO (mg.L <sup>-1</sup> )
Disperse Red 1	Imobilidade	0,92	-
		0,30	-
		2,07	-
		1,18	-
	Imobilidade fêmeas e sucesso de eclosão	0,29	>0,5
		>1	>1
		>5	1
Produto DR1 tratado	Imobilidade	>2	-
	Imobilidade fêmeas e sucesso de eclosão	>2	>2
Disperse Red 13	Imobilidade	1,54	-
		1,44	-
	Imobilidade fêmeas e sucesso de eclosão	>1	>1
		1,73	2
Produto DR13 tratado	Imobilidade	>2	-
	Imobilidade fêmeas e sucesso de eclosão	>5	>5

Apesar do teste de sucesso de eclosão ter sido utilizado por Zaroni (2006) de maneira satisfatória com *Nitokra sp.* em amostras de fase líquida e sólida, mostrando sensibilidade neste *endpoint* e Nipper et al. (2005) que também utilizaram com sucesso o teste de eclosão com o copépodo harpacticóide *Schizopera knabeni* e obteve uma sensibilidade maior que o teste de imobilidade em quase todas as amostras de fase líquida e sólida, onde apenas uma amostra foi mais sensível no teste de imobilidade; Buttino et al. (2011a) sugerem que mesmo não havendo efeitos ou alteração no sucesso de eclosão, os náuplios podem apresentar efeitos e deformações após a eclosão que comprometeriam a prosperidade da população em seu habitat. Ou seja, o

sucesso de eclosão dos ovos é um efeito bastante específico e pode não garantir a prosperidade da população mesmo quando esse endpoint não indica efeitos tóxicos.

Gorbi et al. (2012), recentemente apresentaram uma proposta de padronização de testes com copépodos utilizando o copépodo calanóide *Acartia tonsa*. Sua metodologia consiste na aplicação de dois testes, um agudo (24 e 48h) e um semi crônico (7 dias), ambos com a exposição de embriões, sendo possível controlar a idade dos organismos, e visto que os estágios naupliares são mais sensíveis que as respostas obtidas para a imobilidade dos adultos e que a eclosão dos ovos. Alguns autores já propõem inclusive avaliar a viabilidade dos embriões através da indução de apoptose através de técnicas de microscopia (BUTTINO et al., 2011a; BUTTINO et al., 2011b). Ou seja, novas metodologias para testes com copépodos estão sendo propostas e estudadas visando à padronização de uma metodologia para esses testes e avaliações.

Nesse caso, seriam necessários mais estudos para uma futura padronização de um teste curto com copépodos, visto que já existe norma que compreende a avaliação do ciclo de vida (ASTM, 2004), abrangendo os *endpoints* e fases mais sensíveis da vida desses organismos.

## 6. CONCLUSÃO

A CE50(96h) do corante comercial Disperse Red 1 para o teste de imobilidade com *Nitokra sp.* variou de 0,3 a 2,1 mg.L<sup>-1</sup>. Essa variação foi atribuída primariamente à dispersão do corante em solução. Para o corante Disperse Red 13 a CE50(96h) do teste de imobilidade foi de 1,5 mg.L<sup>-1</sup> (n=2).

Nos testes em que o *endpoint* era sucesso de eclosão a CEO para o Disperse Red 1 e Disperse Red 13 foram de 1 mg.L<sup>-1</sup> e 2 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses resultados demonstram que esse *endpoint* é menos sensível que o teste de imobilidade para esse organismo, para as substâncias utilizadas neste estudo.

O tratamento fotoeletroquímico reduziu a coloração das amostras e parece ter reduzido a toxicidade dos corantes nas condições testadas e em ambos os testes (imobilidade e eclosão). O tratamento é uma alternativa promissora para o tratamento desses compostos. Mais estudos são necessários para verificar e aperfeiçoar as condições do tratamento para permitir a avaliação da toxicidade dos produtos gerados no tratamento, de forma que os parâmetros, como pH, não interfiram nessas avaliações.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYED, L.; MAHDHI, A.; CHEREF, A.; BAKHROUF, A. Decolorization and degradation of azo dye Methyl Red by an isolated *Sphingomonas paucimobilis*: Biototoxicity and metabolites characterization. *Desalination* 274: 272–277. 2011.

ABNT 12713 - NORMA BRASILEIRA ABNT NBR 12713:2004. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* ssp (Crustacea, Cladocera). 2009.

ALVES DE LIMA, R.A.; BAZO, A.P.; SALVADORI, D.M.F.; RECH, C.M.; OLIVEIRA, D.P.; UMBUZEIRO, G.A. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. *Mutation research*. 626: 53-60. 2007.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM E 2317 - Standard guide for conducting renewal microplate-based life-cycle toxicity tests with marine meiobenthic copepod. 2004. 16p.

ARAÚJO-CASTRO, C.M.V.; SOUZA-SANTOS, L.P.; TORREIRO, A.A.G.; GARCIA, K.S. Sensitivity of the marine benthic copepod *Tisbe biminiensis* (copepoda, harpacticoida) to potassium dichromate and sediment particle size. *Brazilian journal of oceanography*. 57. 2009.

ARAÚJO, C.V.M.; DIZ, F.R.; TORNERO, V.; LUBIÁN, L.M.; BLASCO, J.; MORENO-GARRIDO, I. Ranking sediment samples from three spanish estuaries in relation to its toxicity for two benthic species: the microalga *Cylindrotheca closterium* and the copepod *Tisbe battagliai*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 29(2): 393-400. 2010.

ARAÚJO, C.V.M.; DIZ, F.R.; LAIZ, I.; LUBIÁN, L.M.; BLASCO, J.; MORENOGARRIDO, I. Sediment integrative assessment of the Bay of Cádiz (Spain): Na ecotoxicological and chemical approach. *Environmental International*. 35: 831-841.2009.



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

BAE, J. S.; FREEMAN, H. S. Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the *Daphnia magna*. *Dyes and Pigments*. 73 (1): 81-85. 2007a.

BAE, J. S.; FREEMAN, H. S. Aquatic toxicity evaluation of copper-complexed direct dyes to the *Daphnia magna*. *Dyes and Pigments*. 73 (1): 126-132. 2007b.

BAFANA, A.; DEVI, S.S.; CHAKRABARTI, T. Azo dyes: past, present and the future. *Environmental Reviews*. 19: 350-370. 2011.

BEJARANO, A.C.; CHANDLER, G.T.; DECHO, A.W. Influence of natural dissolved organic matter (DOM) on acute and chronic toxicity of the pesticides chlorothalonil, chlorpyrifos and fipronil on the meiobenthic estuarine copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 321(1): 43-57. 2005.

BEJARANO, A.C.; CHANDLER, G.T.; HE, L.; COULL, B.C. Individual to population level effects of South Louisiana crude oil water accommodated hydrocarbon fraction (WAF) on a marine meiobenthic copepod. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 332: 49-59. 2006.

BERGSTEN-TORRALBA, L.R.; NISHIKAWA, M.M.; BAPTISTA, D.F.; MAGALHÃES, D.P.; DA SILVA, M. Decolorization of different textile dyes by *penicillium simplicissimum* and toxicity evaluation after fungal treatment. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 808-817. 2009.

BIRHANLI, A.; OZMEN, M. Evaluation of the toxicity and teratogenicity of six commercial textile dyes using the frog embryo teratogenesis assay – *Xenopus*. *Drug and Chemical Toxicology*. 28 (1): 51-65. 2005.

BREITHOLTZ, M.; WOLLENBERGER, L.; DINAN, L. Effects of four synthetic musks on the life cycle of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Aquatic Toxicology*. 63: 103-118. 2003.

BURTON, G.A.Jr.; DENTON, D.L.; Ho, K.; IRELAND, D.S. Sediment toxicity testing issues and methods In: HOFFMAN, D.J. *Handbook of ecotoxicology*. 2 ed. 885 p. 2009.

BUTTINO, I.; HWANG, J.S.; SUN, C.K.; HSIEH, C.T.; LIU, T.M.; PELLEGRINI, D.; IANORA, A.; SARTORI, D.; ROMANO, G.; CHENG, S.H.; MIRALTO, A. Apoptosis to predict copepod mortality: state of the art and future perspectives. *Hydrobiologia*. 666:257-264. 2011a.

BUTTINO, I.; PELLEGRINI, D.; ROMANO, G.; HWANG, J.; LIU, T.; SARTORI, D.; SUN, C.; MACCHIA, S.; IANORA, A. Study of apoptosis induction using fluorescent and higher harmonic generation microscopy techniques in *Acartia tonsa* nauplii exposed to chronic concentrations of nickel. *Chemistry and Ecology*. 1-8. 2011b.

CATANHO, M.; MALPASS, G.R.P.; MOTHEO, A.J. Photoelectrochemical treatment of the dye reactive red 198 using DSA1 electrodes. *Applied Catalysis B: Environmental*. 62: 193–200. 2006a.

CATANHO, M.; MALPASS, G.R.P.; MOTHEO, A.J. Avaliação dos tratamentos eletroquímico e fotoeletroquímico na degradação de corantes têxteis. *Quimica Nova*. 29 (5): 983-989. 2006b.

CHEQUER, F.M.D.; LIZIER, T.M.; FELÍCIO, R.; ZANONI, M.V.B.Z.; DEBONSI, H.M.; LOPES, N.P.; MARCOS, R.; OLIVEIRA, D.P. Analyses of the genotoxic and mutagenic potential of the products formed after the biotransformation of the azo dye Disperse Red 1. *Toxicology in Vitro*. 25:2054-2063. 2011.

COSTA, C.R. Tratamento de efluentes provenientes de curtumes utilizando os processos eletroquímico e fotoeletroquímico. (Tese de Doutorado). Ribeirão Preto. 270 p. 2009.

FERRAZ, E. R. A.; UMBUZEIRO, G. A.; DE ALMEIDA, G.; CALOTO-OLIVEIRA, A.; CHÉQUER, F. M. D.; ZANONI, M. V. B.; DORTA, D. J.; 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*. 26 (5): 489-497. 2010.

FERRAZ, E.R.A.; GRANDO, M.D.; OLIVEIRA, D.P. The azo dye Disperse Orange 1 induces DNA damage and cytotoxic effects but does not cause ecotoxic effects in *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri*. *Journal of Hazardous Materials*. 192: 628-633. 2011.

GARCIA-MONTAÑO, J.; DOMÈNECH, X.; GARCIA-HORTAL, J.A.; TORRADES, F.; PERAL, J. The testing of several biological and chemical coupled treatments for Cibacron Red FN-R azo dye removal. *Journal of Hazardous Materials* 154: 484–490. 2008.

GLOBALLY HARMONIZED SYSTEM OF CLASSIFICATION AND LABELING OF CHEMICALS (GHS), 2005, Part 3: Health and Environmental Hazards. United Nations. Available at: <http://www.osha.gov/dsg/hazcom/ghsguideoct05.pdf>.

GORBI, G.; INVIDIA, M.; SAVORELLI, F.; FARAPONOVA, O.; GIACCO, E.; CIGAR, M.; BUTTINO, I.; LEONI, T.; PRATO, E.; LACCHETTI, I.; SEI, I. Standardized methods for acute and semichronic toxicity tests with the copepod *Acartia tonsa*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 31 (9): 2023-2028. 2012.

GOTTLIEB, A.; SHAW, C.; SMITH, A.; WHEATLEY, A.; FORSYTHE, S. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. *Journal of Biotechnology*. 101: 49-56. 2003.

GREENSTEIN, D.; BAY, S.; ANDERSON, B.; CHANDLER, G.T.; FARRAR, J.D.; KEPPLER, C.; PHILLIPS, B.; RINGWOOD, A.; YOUNG, D. Comparison of methods for

evaluating acute and chronic toxicity in marine sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27 (4): 933-944. 2008.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes Têxteis – Revisão. *Química Nova*. 23: 71-78. 1999.

HACK, L. A.; TREMBLAY, L.A.; WRATTEN, S.D.; FORRESTER, G.; KEESING, V. Toxicity of estuarine sediments using a full life cycle bioassay with the marine copepod *Robertsonia propinqua*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 70(3):469-474.2008.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURFTON, R. B. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. *Environmental Science and Technology*. 11.(7): 714-719. 1977.

HUNGER, K. (ed.). *Industrial dyes chemistry, properties and applications*. Willey-VCH. Alemanha. 685p. 2002.

IMMICH, A. P. S.; SOUZA, A. A. U.; SOUZA, S. M. A. G. U. Removal of Remazol Blue RR dye from aqueous solutions with Neem leaves and evaluation of their acute toxicity with *Daphnia magna*. *Journal of Hazardous Materials*. 164 (2-3): 1580-1585. 2009.

IQBAL, M. *Textile dyes*. Rahber Publishers. Paquistão. 2008. 181p.

KOVATCH, C.E.; CHANDLER, G.T.; COULL, B.C. Utility of a full life cycle copepod bioassay approach for assessment of sediment associated contaminant mixtures. *Marine Pollution Bulletin*. 38(8): 692-701. 1999.

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*. 66: 2159–2165. 2007.

LOTUFO, G.R. Lethal and sublethal toxicity of sediment-associated fluoranthene to benthic copepods: application of the critical-body-residue approach. *Aquatic Toxicology*. 44 (1-2): 17-30. 1998.

LOTUFO, G.R.; ABESSA, D.M.S. Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. In: NASCIMENTO, I.A.; SOUZA, E.C.P.M.; NIPPER, M. *Métodos em Ecotoxicologia Marinha- Aplicações no Brasil*. Ed. Artes Gráficas e Indústria Ltda. 163-178. 2002.

LUCAS, M.; JEREMIAS, P.F.P.T.; ANDREAUS, J.; BARCELLOS, I.O.; PERALTA-ZAMORA, P. Reutilização de efluente de tingimentos de fibras acrílicas pós-tratamento fotoeletroquímico. *Química Nova*. 31 (6): 1362-1366. 2008.

SOUSA, E.C.P.M.; ZARONI, L.P.; BERGMANN-FILHO, T.U.; MARCONATO, L.A.; KIRSCHBAUM, A.A.; GASPARRO, M.R. Acute sensitivity to *Nitokra sp.* benthic copepod to potassium dichromate and ammonia chloride. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*. 7 (1): 75-81. 2012.

MAUCHLINE, J. The biology of calanoid copepods. *Advances in marine biology* 33:1-710. 1998.

MIRALTO, A.; GUGLIELMO, L.; ZAGAMI, G.; BUTTINO, I.; GRANATA, A.; IANORA, A. Inhibition of population growth in the copepods *Acartia clausi* and *Calanus helgolandicus* during diatom blooms. *Marine Ecology Progress Series*. 254:253-268. 2003.

NIPPER, M.; CARR, R.S.; BIEDENBACH, J.M.; HOOTEN, R.L.; MILLER, K. Fate and effects of picric acid and 2,6-DNT in marine environments: Toxicity of degradation products. *Marine Pollution Bulletin*. 50: 1205-1217. 2005.

NOVOTNÝ, C.; DIAS, N.; KAPANEN, A.; MALACHOVÁ, K.; VÁNDROVCOVÁ, M.; ITÄVAARA, M.; LIMA, N. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes. *Chemosphere*. 63:1436-1442. 2006.

OLIVEIRA, R.F. Estudo da degradação do corante azo disperso azul 291 por cloração química e fotoeletroquímica. Tese de Mestrado. Araraquara. 110 p. 2008.

OLIVEIRA, G.A.R.; FERRAZ, E.R.A.; CHEQUER, F.M.D.; GRANDO, M.D.; ANGELI, P.F.; TSUBOY, M.S.; MARCARINI, J.C.; MANTOVANI, M.S.; OSUGI, M.E.; LIZIER, T.M.; ZANONI, M.V.B.; OLIVEIRA, D.P. Chlorination treatment of aqueous samples reduces, but does not eliminate, the mutagenic effect of the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange 1. *Mutation Research*. 703: 200-208. 2010.

OSUGI, M.E.; UMBUZEIRO, G.A.; DE-CASTRO, F.J.V.; ZANONI, M.V.B. Photoelectrocatalytic oxidation of remazol turquoise blue and toxicological assessment of its oxidation products. *Journal of Hazardous Materials*. 137(2): 871-877. 2006.

OSUGI, M.E.; RAJESHWAR, K.; FERRAZ, E.R.A.; OLIVEIRA, D.P.; ARAUJO, A.R.; ZANONI, M.V.B. Comparison of oxidation efficiency of disperse dyes by chemical and photoelectrocatalytic chlorination and removal of mutagenic activity. *Electrochimica Acta*. 54: 2086-2093. 2009.

PEDROSO, M.S.; PINHO, G.L.L.; RODRIGUES, S.C.; BIANCHINI, A. Mechanism of acute silver toxicity in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*. *Aquatic Toxicology*. 82(3): 173-180. 2007.

PINHO, G.L.L.; BIANCHINI, A. Acute copper toxicity in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*: implications for the development of an estuarine and marine biotic ligand model. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 29 (8): 1834-1840. 2010.

RAISUDDIN, S.; KWOK, K.W.H.; LEUNG, K.M.Y.; SCHLENK, D.; LEE, J.S. The copepod *Tigriopus*: A promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquatic Toxicology*. 83: 161-173. 2007.

SEO, J.S., LEE, K.-W., RHEE, J.-S., HWANG, D.-S., LEE, Y.-M., PARK, H.G., AHN, I.-Y., LEE, J.-S. Environmental stressors (salinity, heavy metals H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) modulate expression of glutathione reductase (GR) gene from the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquatic Toxicology*. 80: 281–289. 2006.

SILVA, M.E.; FIRMINO, P.I.; SOUSA, M.R.; SANTOS, A.B. Sequential anaerobic/aerobic treatment of dye-containing wastewaters: colour and COD removals, and ecotoxicity tests. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 166(4): 1057-1069. 2012.

SOLÍS, M.; SOLÍS, A.; PEREZ, H.I.; MANJARREZ, N.; FLORES, M. Microbial decolouration of azo dyes: A review. *Process Biochemistry*. 47: 1723–1748. 2012.

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A.; OLIVEIRA, D.P.; MURAKAMI, D.; COIMBRÃO, C.A.; STRAUS, E.L. Mutagenic activity of sludge samples generated in dyeing processing textile plants. *Revista Brasileira de Toxicologia*. 17(2): 29-36. 2004.

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

VACCHI, F.I. Avaliação da ecotoxicidade do corante têxtil CI Disperse Red 1 e seus subprodutos clorados utilizando organismos aquáticos. Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas. (Tese de mestrado). 54p. 2012.

VACCHI, F.I.; HONÓRIO, J.G.; RIBEIRO, A.R.; UMBUZEIRO, G.A. Toxicity evaluation of Disperse Red 1 textile dye using freshwater organisms from different trophic levels – a PNEC proposal. Resumo Expandido apresentado no SETAC Berlim. 2012.

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

VERMA, Y. Acute assessment of textile dyes and textile and dye industrial effluents using *Daphnia magna* bioassay. *Toxicology and Industrial Health*. 24: 491-500. 2008.

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

WALTHALL, W. K.; STARK, J. D. The acute and chronic toxicity of two xanthene dyes, fluorescein sodium salt and phloxine B, to *Daphnia pulex*. *Environmental Pollution*. 104 (2): 207-215. 1999.

WANG, C.; YEDILER, A.; LIENERT, D.; WANG, Z.; KETTRUP, A. Toxicity evaluation of reactive dyestuffs, auxiliaries and selected effluents in textile finishing industry to luminescent bacteria *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*. 46: 339-344. 2002.

WANG, C.; YEDILER, A.; LIENERT, D.; WANG, Z.; KETTRUP, A. Ozonation of an azo dye C.I. Remazol Black 5 and toxicological assessment of its oxidation products. *Chemosphere*. 52(7): 1225-1232. 2003.

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*. 12(2). 2006.

ZARONI, L.P. Avaliação da qualidade dos sedimentos marinhos e estuarinos no município de Bertioga – SP. São Paulo. 2006. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. (tese de doutorado). 211p.



ZIRBEL, M.J., MILLER, C.B., BATCHELDER, H.P. Staging egg development of marine copepods with DAPI and PicoGreen®. *Limnology and Oceanography: Methods*. 5, 106-110. 2007.

## APÊNDICE A – Resultados com Zinco

Tabela 1. Testes de sensibilidade com ZnSO<sub>4</sub> realizados com *Nitokra sp.* avaliando imobilidade

Teste	Mês/Ano	CE50 em ZnSO <sub>4</sub> (mg/L)	CE50 em Zn (mg/L)
1	Outubro 2010	3,29	0,75
2	Outubro 2010	3,89	0,88
3	Dezembro 2010	4,43	1
4	Janeiro 2011	3,16	0,72
5	Fevereiro 2011	2,65	0,6
6	Março 2011	2,27	0,52
7	Maio 2011	3,59	0,82
8	Maio 2011	3,36	0,76
9	Junho 2011	3,11	0,71
10	Julho 2011	1,44	0,33
11	Dezembro 2011	2,54	0,58
12	Março 2012	2,24	0,51
13	Abril 2012	2,04	0,46
14	Maio 2012	1,76	0,40
15	Junho 2012	4,7	1,07
16	Agosto 2012	3,64	0,83
17	Setembro 2012	2,19	0,49
18	Outubro 2012	1,62	0,37
19	Novembro 2012	1,32	0,30

Tabela 2. Teste 1 de sucesso de eclosão com sulfato de zinco (concentração em ZnSO<sub>4</sub>)

Conc. (mg/L)	Réplicas										total náuplios	fêmeas imóveis
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0	6	4	11	6	8	9	7	7	11	10	79	1
0,01	8	9	0	5	0	5	7	9	3	4	50	4
0,05	7	6	10	7	11	10	7	7	10	8	83	1
0,1	8	5	10	7	7	3	6	4	7	5	62	1
0,5*	3	5	5	7	0	6	7	10	0	6	49	3

\*Diferem estatisticamente do controle.

Tabela 3. Teste 2 de sucesso de eclosão com sulfato de zinco (concentração em ZnSO<sub>4</sub>)

Conc. (mg/L)	Réplicas										total náuplios	fêmeas imóveis
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0	2	10	8	10	7	9	9	13	9	7	84	0
0,01	7	9	7	12	0	10	5	0	4	6	60	0
0,05	8	9	9	7	8	12	9	1	12	8	83	0
0,1	0	9	4	14	3	7	17	8	6	8	76	0
0,5	12	7	0	6	7	13	16	11	7	11	90	0
1	8	7	7	7	9	14	5	7	13	0	77	0

Tabela 4. Teste 3 de sucesso de eclosão com sulfato de zinco (concentração em ZnSO<sub>4</sub>)

Conc. (mg/L)	Réplicas										total náuplios	fêmeas imóveis
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0	1	9	12	15	10	0	11	0	13	10	81	0
0,5	8	0	12	12	16	5	0	8	8	10	79	0
1	16	9	7	13	10	11	10	8	6	15	105	0
2,5	10	9	12	7	8	3	8	7	10	9	83	0
3,5	3	8	8	3	0	4	5	4	10	4	49	1
5,5	7	6	6	0	0	7	4	5	0	6	41	10
10	11	7	0	5	0	14	0	6	0	0	43	10

Tabela 5. Teste 4 de sucesso de eclosão com sulfato de zinco (concentração em ZnSO<sub>4</sub>)

Conc. (mg/L)	Réplicas										total náuplios	fêmeas imóveis
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0	10	10	9	8	11	9	5	8	5	5	80	0
0,1	7	10	9	10	5	9	13	10	12	5	90	0
0,5	10	6	9	8	7	10	11	9	8	6	84	0
1	6	8	8	8	8	11	6	8	9	7	79	0
5*	7	5	8	6	6	7	2	4	6	4	55	8

\*Difere estatisticamente do controle.

Tabela 6. Teste 5 de sucesso de eclosão com sulfato de zinco (concentração em ZnSO<sub>4</sub>)

Conc. (mg/L)	Réplicas										total náuplios	fêmeas imóveis
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0	8	9	6	7	7	3	6	4	5	9	64	0
0,5	5	7	5	0	5	6	2	7	0	8	45	0
1	7	2	0	8	5	2	6	6	6	3	45	1
2*	8	3	5	1	5	2	4	1	2	4	35	5
3*	3	2	4	3	0	3	1	8	5	4	33	10
5*	4	5	3	0	0	3	3	0	1	0	19	10

\*Difere estatisticamente do controle.

## APÊNDICE B – Resultados com Disperse Red 1

Tabela 7. Teste 1 de imobilidade com Disperse Red 1 e *Nitokra sp.*

Conc.(mg/L)	Réplicas			Nº imóveis	% imóveis
	1	2	3		
0	1	0	0	1	3,3
0,1	5	4	5	14	46
0,5	2	4	7	13	43
1	6	5	4	15	50
5	9	5	8	22	73
10	8	9	9	26	86
15	10	9	9	28	93
20	9	9	9	27	90

CE50=0,92 mg/L (0,24-3,54)

Tabela 8. Teste 2 de imobilidade com Disperse Red 1 e *Nitokra sp.*

Conc.(mg/L)	Réplicas				Nº imóveis	% imóveis
	1	2	3	4		
0	1	1	0	0	2	0
0,05	1	0	0	0	1	2,5
0,1	3	4	2	1	10	25
0,5	10	9	7	8	34	85
1	6	3	9	8	26	65
2,5	8	8	6	7	29	72,5
5	10	9	9	10	38	95
10	8	9	7	8	32	80

CE50=0,3 mg/L (0,2-0,4)

Tabela 9. Teste 3 de imobilidade com Disperse Red 1 e *Nitokra sp.*

Conc.(mg/L)	Réplicas				Nº imóveis	% imóveis
	1	2	3	4		
0	0	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0	0
0,5	0	2	3	2	7	17,5
1	1	1	3	2	7	17,5
2,5	4	9	3	7	23	57,5
5	8	9	8	9	34	85

CE50=2,07 mg/L (1,61-2,67)

Tabela 10. Teste 4 de imobilidade com Disperse Red 1 e *Nitokra sp.*

Conc.(mg/L)	Réplicas				Nº imóveis	% imóveis
	1	2	3	4		
0	0	0	0	0	0	0
0,1	3	0	0	3	6	15
0,5	6	2	5	6	19	47,5
1	5	5	3	6	19	47,5
2,5	7	6	4	3	20	50
5	5	6	9	8	28	70

CE50=1,18mg/L (0,64-2,18)

Tabela 11. Teste de imobilidade com Disperse Red 1 tratado fotoeletroquimicamente

Conc.(mg/L)	1	2	3	Nº imóveis	% imóveis
0	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0	0
1	2	1	2	5	16,6
2	1	3	3	7	23,3
4	10	10	10	30	100

Dados considerados inválidos devido à interferência nos parâmetros físico-químicos

Tabela 12. Parâmetros finais do teste de imobilidade com Red 1 tratatado fotoeletroquimicamente

Parâmetros finais					
Conc. (mg/L)	Mort. (%)	pH	O.D. (mg/L)	Cond.(mS/cm)	Salinidade
0	0	7,6	6	27,3	22
0,1	0	7,6	6,7	26,6	22
0,5	0	7,6	6,6	26	22
1	16	7,8	6,6	25,8	21
2	23	7,1	6,1	24,6	21
4	100	4,2	6,4	23	19,5

Dados considerados inválidos devido à interferência nos parâmetros físico-químicos

Tabela 13. Teste 1 de sucesso de eclosão com Disperse Red 1

Conc. (mg/L)	Réplicas										total náuplios	fêmeas imóveis
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0	6	4	11	6	8	9	7	7	11	10	79	1
0,01	8	2	8	7	6	4	4	7	7	9	62	1
0,05	5	8	8	11	5	0	8	0	4	9	58	3
0,1	6	6	5	10	10	6	2	6	3	7	61	3
0,5	9	8	7	7	2	6	9	4	6	0	58	6



Tabela 14. Teste 2 de sucesso de eclosão com Disperse Red 1

Conc. (mg/L)	Réplicas										total náuplios	fêmeas imóveis
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0	6	9	9	6	6	11	0	9	10	12	78	0
0,01	10	8	6	10	5	8	10	3	5	0	65	0
0,05	4	9	6	7	5	12	6	8	9	8	74	0
0,1	5	9	0	10	12	12	6	5	10	6	75	0
0,5	9	10	6	16	9	8	9	15	7	7	96	0
1	4	18	9	4	8	12	10	11	13	14	103	0

Tabela 15. Teste 3 de sucesso de eclosão com Disperse Red 1

Conc. (mg/L)	Réplicas										total náuplios	fêmeas imóveis
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0	8	9	6	7	7	3	6	4	5	9	64	0
0,1	9	0	4	6	8	2	6	7	4	8	54	0
1 *	3	4	5	4	3	5	0	4	4	2	34	0
2 *	5	4	6	1	5	1	6	1	5	3	37	2
3 *	2	3	3	5	1	3	3	2	3	2	27	2
5 *	2	3	4	3	3	2	2	0	2	2	23	1

\*Difere estatisticamente do controle.

Tabela 16. Teste de sucesso de eclosão com Disperse Red 1 tratado fotoeletroquimicamente

Conc. (mg/L)	Réplicas										total náuplios	fêmeas imóveis
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0	7	7	10	8	8	7	10	6	8	7	78	0
0,5	5	9	2	9	9	9	8	9	9	7	76	0
1	11	9	9	6	0	6	7	12	6	7	73	1
2	9	6	3	6	3	6	7	2	8	6	56	0
5	5	8	5	6	3	0	5	5	6	5	48	10
10	12	8	10	7	7	9	7	9	9	9	87	10

Dados considerados inválidos devido à interferência nos parâmetros físico-químicos

Tabela 17. Parâmetros finais do teste de imobilidade com Disperse Red 1 tratado fotoeletroquimicamente

Parâmetros finais					
Conc. (mg/L)	Mort. (%)	pH	O.D. (mg/L)	Cond.(mS/cm)	Salinidade
0	0	7,6	7,5	28,36	21,5
0,5	0	7,5	7,8	26,59	21
1	0	7,39	6,4	26,74	21
2	0	7,04	6,7	25,2	20
5	100	3,05	6,7	22,66	18,5
10	100	2,3	6,7	19,39	15,5

Dados considerados inválidos devido à interferência nos parâmetros físico-químicos

## APÊNDICE C – Resultados com Disperse Red 13

Tabela 18. Teste 1 de imobilidade com Disperse Red 13 realizado com *Nitokra sp.*

Conc.(mg/L)	Réplicas				Nº imóveis	% imóveis
	1	2	3	4		
0	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0
0,1	1	0	0	1	2	5
0,5	2	3	0	1	6	15
1	0	1	2	5	8	20
2,5	4	6	6	6	22	55
5	10	10	10	10	40	100

CE50=1,54 mg/L (1,23-1,92)

Tabela 19. Teste 2 de imobilidade com Disperse Red 13 realizado com *Nitokra sp.*

Conc.(mg/L)	Réplicas				Nº imóveis	% imóveis
	1	2	3	4		
0	0	0	1	0	1	2,5
0,1	1	1	5	1	8	20
0,5	4	1	2	2	8	20
1	4	2	0	2	8	20
2,5	10	9	10	9	38	95
5	10	10	10	10	40	100

CE50=1,44 mg/L (1,25-1,66)

Tabela 20. Teste de imobilidade com o Disperse Red 13 tratado fotoeletroquimicamente

Conc.(mg/L)	Réplicas			Nº imóveis	% imóveis
	1	2	3		
0	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0

Tabela 21. Parâmetros finais do teste de imobilidade com Disperse Red 13 tratado fotoeletroquimicamente

Parâmetros finais					
Conc.(mg/L)	Mort. (%)	pH	O.D. (mg/L)	Cond.(mS/cm)	Salinidade
0	0	8,02	3,15	33,83	20,5
0,1	0	8,05	3,45	33,16	21
0,5	0	8,04	3,71	32,15	20,5
1	0	8,04	3,81	31,49	20,5
2	0	7,98	3,92	29,75	21

Tabela 22. Teste 1 de sucesso de eclosão com Disperse Red 13

Conc.(mg/L)	Réplicas										total náuplios	fêmeas imóveis
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0	12	10	11	5	11	11	13	13	9	5	100	0
0,01	0	7	10	8	8	16	6	14	5	12	86	0
0,05	7	13	15	8	12	11	12	10	8	5	101	1
0,1	7	9	8	10	11	14	10	3	13	7	92	0
0,5	8	7	10	6	15	4	8	6	8	8	80	0
1	13	11	10	8	9	10	5	8	9	7	90	0

Tabela 23. Teste 2 de sucesso de eclosão com Disperse Red 13

Conc. (mg/L)	Réplicas										total náuplios	fêmeas imóveis
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0	13	8	7	9	9	10	6	6	12	6	86	1
0,1	9	5	7	10	12	8	9	6	6	4	76	1
1	9	8	7	8	10	9	11	7	8	9	86	2
2*	5	5	6	3	6	7	8	7	4	4	55	3
3*	4	6	0	5	4	0	6	3	8	2	38	10
5*	2	0	1	4	1	0	4	5	5	3	25	10

\*Difere estatisticamente do controle

Tabela 24. Teste de sucesso de eclosão com Disperse Red 13 tratado fotoeletroquimicamente

Conc. (mg/L)	Réplicas										total náuplios	fêmeas imóveis
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0	9	11	7	7	6	13	5	5	12	6	81	1
0,5	6	11	11	6	10	5	10	7	9	6	81	0
1	9	8	8	9	10	7	7	9	7	12	86	1
2	7	12	8	14	5	6	7	8	9	5	81	0
5	10	14	9	15	9	8	6	11	11	4	97	0

Tabela 25. Parâmetros finais do teste com Disperse Red 13 tratado fotoeletroquimicamente

Parâmetros finais					
Conc. (mg/L)	Mort. (%)	pH	O.D. (mg/L)	Cond.(mS/cm)	Salinidade
0	10	8	3,34	33,05	21,5
0,5	0	7,98	4,19	33,06	21
1	10	7,97	3,8	32,52	21
2	1	7,9	4,12	30,25	20
5	0	7,83	4,13	26,1	17