

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CAMPUS DOIS VIZINHOS

JAINÉ SGUISSARDI

**GENOTOXICIDADE DO EFLUENTE TÊXTIL EM CÉLULAS HEPÁTICAS E
SANGUÍNEAS DE *Rhamdia quelen* (PISCES, SILURIFORME) ATRAVÉS DO
ENSAIO COMETA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS

2022

JAINÉ SGUISSARDI

GENOTOXICIDADE DO EFLUENTE TÊXTIL EM CÉLULAS HEPÁTICAS E SANGUÍNEAS DE *Rhamdia quelen* (PISCES, SILURIFORME) ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA

Textile effluent genotoxicity in liver and blood cells through *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriform) the comet assay

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso Superior em Ciências Biológicas – Licenciatura, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Dois Vizinhos como requisito parcial para aprovação em Trabalho de Conclusão de Curso 2

Orientadora: Prof. Dra. Nédia de Castilhos Ghisi

Coorientadora: Msc. Marina Wust Vasconcelos

DOIS VIZINHOS

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

JAINE ESGUISSARDI

GENOTOXICIDADE DO EFLUENTE TÊXTIL EM CÉLULAS HEPÁTICAS E SANGUÍNEAS DE *Rhamdia quelen* (PISCES, SILURIFORME) ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 24/jun/2022

Nédia de Castilhos Ghisi

Doutorado

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus Dois Vizinhos*

Thaís Fernandes Mendonça Mota

Doutorado

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus Dois Vizinhos*

Ana Paula da Silva

Mestrado

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus Dois Vizinhos*

DOIS VIZINHOS

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço Primeiramente, a Deus por me conceder o dom da vida e a saúde, para a realização de mais esta etapa.

Agradeço imensamente a meus pais, Olimar e Nelci, por serem meus exemplos de vida, minha força em todas as horas e em todas as minhas decisões. Gratidão por serem meu apoio e incentivo, em nunca me deixar desistir dos meus sonhos e por fazerem tudo que está ao seu alcance por mim, tornando minha caminhada melhor.

Agradeço a família que construí, meu marido Rodrigo por me incentivar e me ouvir quando precisei, por ser compreensivo nos momentos de ausência, e por cuidar tão bem do nosso filho quando não estava presente. Agradeço infinitamente ao meu filho João Miguel, o qual veio para me dar muito mais força e vontade de lutar pelos meus objetivos, você é minha inspiração para chegar cada vez mais longe.

Agradeço imensamente a minha orientadora professora doutora Nédia de Castilhos Ghisi, pela sabedoria e ensinamentos transmitidos durante esta trajetória. Obrigada por confiar em mim a fazer parte de seu grupo de pesquisa, por ser bolsista do projeto por dois anos e por me ensinar a criar gosto pela pesquisa, meu muito obrigado.

Agradeço a minha coorientadora mestre Marina, por compartilhar sua pesquisa, pelos ensinamentos e pela paciência em me explicar inúmeras vezes todos os processos. Obrigada por toda a contribuição no meu trabalho.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Campus Dois Vizinhos, por todo o corpo docente que fez parte da minha trajetória dentro do curso de Biologia, pelo espaço e pelos laboratórios para a realização desta pesquisa.

A minha Banca doutora Thais e mestre Ana Paula, e ao professor suplente doutor Fernando por todas as contribuições.

E por fim, agradeço a instituição de fomento CNPq edital PROPPG – 02/2021 (PIBIC – PIBIC-AF) - programa institucional de iniciação científica da utfpr e edital PROPPG 07/2021 programa de apoio à pesquisa científica e desenvolvimentotecnológico (PAPCDT)pelo financiamento desta pesquisa. E ao laboratório Multiusuário de Análises Biológicas e Biologia Molecular (BioMol) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Dois Vizinhos pelas análises realizadas.

Dedico este trabalho à minha família, em especial ao meu
filho João Miguel, pelos momentos de ausência.

RESUMO

As indústrias têxteis vêm crescendo gradativamente, gerando empregos e contribuindo para a rotatividade do setor socioeconômico. Porém, também estão entre as maiores geradoras de resíduos poluentes, principalmente o efluente têxtil, que é gerado em grande volume e com altas doses de corantes e outras substâncias tóxicas. É um resíduo complexo, de difícil degradação, que contém substâncias xenobióticas, recalcitrantes e tóxicas. Quando em contato com os corpos hídricos sem o devido tratamento, estes compostos podem causar danos à saúde da biota aquática e desencadear diversos impactos ambientais. É importante estudar e identificar os possíveis danos deste efluente, para auxiliar com desenvolvimento de melhores formas de gestão destes resíduos. O presente estudo tem por objetivo analisar a genotoxicidade do efluente têxtil em sua composição bruta e tratada sobre o bioindicador *Rhamdia quelen*. Os 180 exemplares de *R. quelen* foram submetidos de forma sobreaguda a concentrações de 0% (controle); 1,25%; 2,5%; 5,0%; 7,5% e 10% (em triplicatas) do efluente bruto e tratado de uma indústria de produção de jeans. Foram utilizados animais de ambos os sexos divididos em 18 caixas de 60 litros. A exposição foi por sete dias em condições controladas. Ao final do período experimental, coletou-se tecido sanguíneo e hepático dos indivíduos. Essas amostras foram submetidas ao teste de eletroforese em gel de célula única, comumente conhecido como ensaio cometa, para analisar possíveis danos genotóxicos. As lâminas foram coradas a base de brometo de etídio e as análises foram com microscopia de fluorescência. Analisou-se 100 nucleoides/lâmina, seguindo contagem de danos de 0 (ausência de danos) até dano 4 (apoptose celular). A análise dos danos não apresentou diferença significativa entre as diluições do efluente bruto e tratado em comparação ao controle. Em eritrócitos o efluente bruto causou danos significativamente maiores do que o tratado como esperado. Já em hepatócitos os danos não foram significativos em comparação dos efluentes bruto e tratado. Com este trabalho conclui-se que o efluente bruto causa danos genotóxicos a baixas concentrações em curtos períodos de exposição, enquanto o efluente tratado foi seguro em concentração < 10% em exposição de até sete dias.

Palavras-chave: Toxicidade; Peixes; Biomarcador ; Águas residuais Têxteis.

ABSTRACT

Textile industries have been growing gradually, generating jobs and rotating the socioeconomic sector. However, they are also among the largest generators of polluting waste. The textile effluent is generated in large volumes and with high doses of dyes and other toxic substances. It is a complex residue, difficult to degrade, containing xenobiotic, recalcitrant and toxic substances. When in contact with water bodies without proper treatment, these compounds can cause damage to the health of aquatic biota and trigger various environmental impacts. The present study aims to analyze the genotoxicity of textile effluent in its raw composition and treated on the bioindicator *Rhamdia quelen*. For that, preliminary tests were carried out to determine the lethal concentration. Subsequently, 180 specimens of *R. quelen* were subchronically submitted to concentrations of 0% (control); 1,25%; 2,5%; 5%; 7,5% and 10% (in triplicates) of the raw and treated effluent from a textile industry. Animals of both sexes were divided into 18 boxes of 60 liters. The exposure was for seven days under controlled conditions. At the end of the experimental period, blood and liver tissue were collected from the individuals. These samples were subjected to the single cell gel electrophoresis test, commonly known as the comet assay. This technique was used because it is considered sensitive, simple and fast to analyze possible genotoxic damage. The slides were stained with ethidium bromide and the analyzes were performed with fluorescence microscopy. 100 nucleoids/slide were analyzed, following damage counts from 0 (no damage) to damage 4 (cellular apoptosis). With the analysis of the data, it can be observed that there was no significant difference between the dilutions of the raw and treated effluent compared to the control. In erythrocytes, the raw effluent caused significantly greater damage than the treated effluent as expected. In hepatocytes, the damages were not significant raw and treated effluents. With this work, it is concluded that the raw effluent causes genotoxic damage at low concentrations in short periods, while the treated effluent proved to be safe at a concentration of 10% for up to seven days.

Keywords: toxicity; Fish; Biomarker; Textile waste water;

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 4 |
| 2. OBJETIVOS | 5 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 5 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 5 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 6 |
| 3.1 A INDÚSTRIA TÊXTIL E A GERAÇÃO DE EFLUENTES..... | 6 |
| 3.2 RISCOS AMBIENTAIS | 6 |
| 3.3 TOXICIDADE..... | 7 |
| 3.4 BIOINDICADOR <i>Rhamdia quelen</i> | 8 |
| 3.5 GENOTOXICIDADE E O USO DE BIOMARCADORES | 9 |
| 3.6 ENSAIO COMETA | 10 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 12 |
| 4.1 EFLUENTE TESTADO E BIOINDICADOR | 12 |
| 4.2 BIOENSAIO SOBREAGUDO COM JUVENIS <i>Rhamdia quelen</i> | 12 |
| 4.3 ENSAIO COMETA | 13 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 16 |
| 6. CONCLUSÃO | 21 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 22 |

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento gradativo da população e a alta procura por empregos, a indústria têxtil acompanha esse gradiente, e vem se destacando em crescimento e geração de empregos com um forte potencial econômico (ABIT,2018). No entanto, além de se destacar no quesito socioeconômico, está entre as indústrias mais geradoras de resíduos poluentes, e que utiliza grande quantidade de água em seu processamento. O efluente têxtil, gerado durante todo o processamento, principalmente na etapa de tingimento, é considerado, nos termos da resolução CONAMA N° 237, de 19 de dezembro de 1997, como um poluidor danoso ao meio ambiente, principalmente em seu estado bruto, onde possuem altas quantidades de corantes e substâncias recalcitrantes e tóxicas ao meio ambiente e sua biota.

Ritter (2016) corrobora com o descrito acima e incrementa que o efluente têxtil possui quantidades excessivas de sólidos suspensos e grande variação de pH, tornando-o assim com uma característica altamente genotóxica. Quando descartado em ambientes aquáticos, o efluente têxtil é capaz de causar alta degradação ao ecossistema e biota aquática, além dos compostos químicos presente, sua turgidez causa impacto visual e pode acarretar a interferência da penetração de luz, afetando a fotossíntese (CONAMA, 1997). O efluente têxtil também diminui a entrada de oxigênio e causa danos à saúde dos organismos aquáticos (CONAMA, 1997).

Segundo Cirra, (2004), a indústria têxtil tem a obrigação principal e de grande importância de licenciamento ambiental, para descarte de efluente têxtil devidamente tratado no ambiente. O efluente têxtil descartado na natureza não pode causar danos genotóxicos, celulares, fisiológicos e morfológicos a nenhum nível da organização biológica, organismo vivente em corpos hídricos e toda a população em contanto com o desague, (CIRRA, 2004). A Resolução do CONAMA n° 430 de 13 de maio de 2011, também adverte que é necessário o tratamento adequado do efluente e esse só poderá ser descartado se não causar danos fisiológicos, genéticos e comportamentais a vida aquática.

Para analisar o potencial efeito que o efluente têxtil possa causar no material genético, as análises foram realizadas através do ensaio cometa, pois o mesmo permite uma visualização da fragmentação do DNA, como danos genéticos, de acordo com Ferraro (2009) também é uma técnica eficiente, rápida e confiável. Diante deste contexto o presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos genotóxicos do efluente têxtil em sua composição bruta e tratada sobre o peixe *Rhamdia quelen* por meio do ensaio cometa.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a genotoxicidade do efluente têxtil de uma indústria de produção de jeans em sua composição bruta e tratada sobre o bioindicador *R. quelen* por meio do ensaio cometa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os possíveis danos genéticos ocasionados pelo efluente têxtil em células sanguíneas e hepáticas através de ensaio cometa.
- Analisar a relação de danos sub-letais em comparação com a diluição do efluente e o tempo de exposição.
- Comparar a quantificação dos danos entre o efluente tratado e o efluente bruto, e se de fato o tratamento reduz o potencial efeito genotóxico.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A INDÚSTRIA TÊXTIL E A GERAÇÃO DE EFLUENTES

A indústria têxtil brasileira possui um valor socioeconômico, e um potencial notável no que diz respeito a geração de empregos devido ao crescimento gradativo da população de 0,79% ao ano (IBGE 2019). Com isso, o Ministério do Trabalho aponta a indústria têxtil como um dos setores que mais contribui para admissões (EMPREGO, 2019). O setor têxtil conta com aproximadamente 30 mil empresas em todo o território nacional, sendo que as regiões sul e sudeste são as que apresentam maior quantidade de unidades fabris instaladas (ABIT, 2018).

Entretanto, observa-se na resolução CONAMA N° 237, de 19 de dezembro de 1997, que as atividades mais geradoras de poluição se encontram nas indústrias têxteis. As águas residuais são de difícil degradação, apresentando risco ao meio ambiente, decorrente da grande concentração de corantes utilizados na coloração de tecidos, que durante o processo de coloração não são totalmente fixados aos tecidos, fazendo parte da composição do efluente.

O processamento na indústria têxtil é subdividido em cinco etapas. Este se inicia com o processamento e produção das fibras, a fiação, terceira etapa é tecelagem e malharia para de fato se tornar o tecido, a quarta etapa é onde grande parte do efluente é produzido, pois é a fase de tingimento, onde o tecido também vem a ser amaciado e/ou estampado, resultando em uma grande quantidade de líquido carregado de corante, a quinta e última etapa é a confecção (HASSEMER, 2006).

3.2 RISCOS AMBIENTAIS

Compostos químicos sempre podem apresentar riscos aos ambientes e a biota aquática, também podem interagir com outras substâncias causando um potencial altamente tóxico. Por este motivo, estes riscos a biota aquática são de observação e julgamento científico, podendo assim descobrir seus efeitos danosos e entrar com ações de julgamento da necessidade de tratamento ou proibição de descarte na natureza (BERTOLETTI, 2013).

A resolução 001 de 23 de janeiro de 1986 do CONAMA, Art. 1º relata risco ambiental como “qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente”. Desta forma, todas as atividades que venham a causar danos à vida e segurança dos seres aquáticos ou afetar a sanidade e bem-estar da população em contato direto ou indiretamente é considerada como risco ambiental (CONAMA, 1986).

De acordo com Revankar (2007) a grande maioria da poluição através de corantes é oriunda de efluentes têxteis. A legislação ambiental brasileira possui critérios de descartes destes efluentes nos corpos d'água, de modo que não seja danoso à saúde e qualidade da biota aquática, mantendo o equilíbrio ecológico (CONAMA nº 430/2011). Desta maneira, é necessário que tratamentos sejam feitos nesses resíduos líquidos, podendo ser por métodos físico-químicos, biológicos ou uma combinação de métodos (NUNES, 2019).

Efluentes têxteis estão classificados como um dos resíduos líquidos mais poluentes, por possuírem uma natureza recalcitrante e xenobiótica. Isso deve-se ao fato de que o mesmo contém grande carga orgânica de corantes com coloração concentrada, altos valores de pH, sais, ácidos, oxidantes, detergentes, dentre outras substâncias que prejudicam o meio ambiente e a saúde de seres em contato, sejam eles fisiológicos ou estresse (VIKRANT et al., 2018).

Corantes utilizados nas indústrias têxteis podem ter sua origem tanto de fontes sintéticas ou naturais, sendo orgânico ou inorgânico, o qual tem por função dar cor as fibras. No entanto, a mesma característica que o permite fixar a superfície dos tecidos e ali permanecer por longo tempo, também é responsável por sua alta recalcitrância e toxicidade (BANAT et al., 1996). As indústrias têxteis também geram grandes quantidade de sólidos suspensos, de metais pesados, compostos orgânicos e surfactantes (ARAÚJO; YOKOYAMA, 2006). Além de ser utilizada uma grande quantidade de água para todo o processamento, tem significativa quantidade de misturas de solventes, microplásticos, detergentes e demais aditivos químicos que acabam tornando a água inadequada para qualquer outra maneira de reutilização (CIRRA, 2003).

A Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011 “determina as condições, parâmetros, padrões e diretrizes para o lançamento de efluentes em corpos de água receptores, que só deverá acontecer após o devido tratamento”. Esse efluente descartado nos corpos hídricos não devem causar nenhum tipo de efeitos letais ou alterações de comportamentos, tanto na questão reprodutiva, fisiológica ou genética da vida aquática (CONAMA, 2011).

3.3 TOXICIDADE

Toxicologia é a ciência que estuda os efeitos que são causados por substâncias químicas em seres vivos (HODGSON, 2004). A toxicidade revela os efeitos danosos provocados a um organismo vivo devido ao contato com o agente tóxico. Diante da exposição a agentes tóxicos, os ensaios toxicológicos vêm a ter um papel de grande importância para

poder determinar as concentrações de efeitos observados e não observados e assim poder estimar sua toxicidade, podendo desta maneira utilizar concentrações em testes de ensaio laboratoriais (COSTA et al., 2008).

A resolução 430 do CONAMA (2011) em seu art. 4 do capítulo I, ressalta que testes de ecotoxicidade em diferentes concentrações podem ser de grande valia para observar efeitos nocivos de substâncias tóxicas, como o efluente têxtil, e para isso são utilizados bioindicadores de grupos ecologicamente relevantes. Esses testes se fazem necessário para uma observação mais aprofundada de danos que esses efluentes possam vir a causar. Destaca-se que somente a avaliação por meio de testes e análises físico-químicos com os padrões liberados pela legislação ambiental não é possível observar os reais riscos a biota aquática. Por meio de exposições sub-letais de aproximadamente sete dias, é possível analisar se a substância tem potencial genotóxico ou não (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

3.4 BIOINDICADOR *Rhamdia quelen*

Esta espécie é considerada de qualidade e de confiança como organismos bioindicadores em pesquisas, pois expostos a agentes tóxicos em condições controladas apresentam mudanças em seus padrões antioxidantes e metabólicos (FERRARO, 2009). Também apresentam fácil adaptação à ambientes laboratoriais, manuseio e transporte (DE MENEZES et al., 2011).

Rhamdia quelen é um peixe pertencente a classe Actinopterygii, conhecido popularmente como jundiá (figura 1). Sua distribuição estende-se da América do Sul até América Central, vivem em águas doces e permanecem a aproximadamente até três metros de profundidade, tendo contato com materiais do fundo dos rios e com fácil adaptação a diferentes temperaturas (FERRARO, 2009). São sensíveis a biomagnificação, o que causa acúmulo de substâncias no organismo devido ao seu hábito alimentar, o qual convém a pequenos peixes e organismos em sedimentos (ROQUE, 2018). Losekann et al., (2008) destaca também que o jundiá também é popularmente reconhecido como fonte alimentar humana, o que causa grande preocupação pois é uma espécie sensível a contaminações, acarretando uma possível alimentação tóxica.

Figura 1: Exemplar de *Rhamdia quelen* utilizado neste estudo



Fonte: Vasconcelos, 2021

3.5 GENOTOXICIDADE E O USO DE BIOMARCADORES

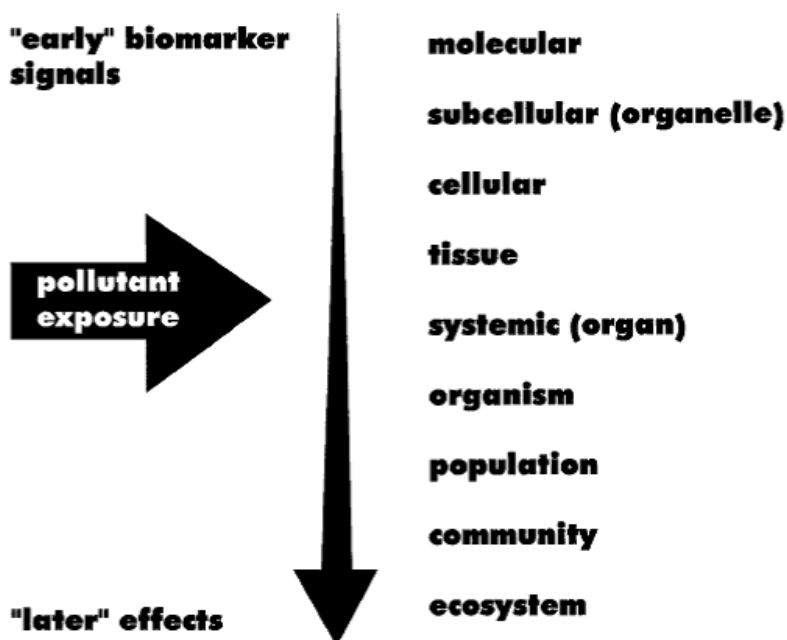
Biomarcadores são utilizados para avaliação de efeitos biológicos, fisiológicos e comportamentais, em níveis moleculares, bioquímicos e fisiológicos, de um determinado organismo, que venha a sofrer exposições danosas tóxicas e xenobióticas (FLORES et al., 2013; DE OLIVEIRA, 2014; SILVA, 2016). Em bioensaios utilizando exemplares de peixes, os tecidos mais afetados quando expostos as substâncias tóxicas e recalcitrantes, são as brânquias, fígado, rim, músculos e o tecido sanguíneo, pois em seu metabolismo exercem a função de excreção de substâncias tóxicas do organismo (ROCHA, 2003). Quando o organismo é exposto a substâncias tóxicas, o fígado apresenta grandes alterações celulares e fisiológicas, pois além de fazer a secreção da bile atua com outras substâncias requerentes ao organismo como lipídios e ácidos graxos, assim contribuindo para desintoxicação e homeostase do organismo (MELETTI; ROCHA, 2003).

Segundo Oost & Beyer (2002), danos genotóxicos tendem a se manifestar altamente posterior a curtos períodos de exposição a um agente poluente. Nos sistemas biológicos observa-se uma sequência de resposta ao estresse causado por esse agente poluidor, como indicado na figura 2. Os danos mais precoces são visualizados a níveis moleculares e celulares, em contexto ambiental esses biomarcadores são obtidos como sensíveis,

demonstram que o poluente em contato com o organismo é distribuído aos tecidos ocasionando efeitos tóxicos. Sucessivamente com maior tempo de exposição, a hierarquia de biomarcadores cresce gradativamente ocasionando danos posteriores mais tardios a níveis de sistema/população, assim obtendo maior dificuldade de reversão (OOST et al., 2002).

Substâncias potencialmente genotóxicas possuem capacidade de alteração ou dano na estrutura e função do material genético (WEISBURGER 1999). De acordo com Oliveira (2013) esses danos ou alterações genéticas transmitidos na replicação celular causam o que chamamos de mutação, esse evento na maioria das vezes causam efeitos danosos ao organismos exposto.

Figura 2: Níveis de biomarcadores



FONTE: OOST et al. (2002)

3.6 ENSAIO COMETA

O teste do cometa é empregado para a avaliação de danos genotóxicos, este teste toxicogenético possibilita a avaliação de quebras ao DNA. As células são expostas a eletroforese por corrente elétrica e as células que sofreram danos genético apresentam o DNA fragmentado (FERRARO, 2009). Estudos apontam que o potencial genotóxico de efluentes têxteis testados em espécime de *Oreochromis niloticus* (tilápia) analisados através do ensaio cometa no tecido sanguíneo apontaram riscos cito-genotóxicos, mesmo em diluições baixas.

Isto evidencia que são necessárias ferramentas para analisar os impactos do efluentes têxteis (HEMACHANDRA, 2016).

Ensaio cometa é uma forma confiável e rápida de análise de danos em DNA de células individualizadas. As células submetidas ao protocolo do ensaio cometa, passam para uma lâmina em suspensão a agarose de baixo ponto de fusão e a agarose normal, submetida a lise celular e posteriormente eletroforese e, em seguida é analisada através de microscopia de fluorescência, com coloração a base de brometo de etídio (FERRARO, 2009). Com isto, quanto maior o dano causado ao DNA celular, maior será a diferença do deslocamento de fragmentos de DNA formando uma espécie de cauda, o que remete a um cometa (SINGH et al., 1988). Os danos são contabilizados devido ao diâmetro formado pelos fragmentos do núcleo e o comprimento de sua cauda (fragmentação de DNA), são então contabilizados desde dano 0 (danos ausentes) até dano 4 (apoptose celular) (FERRARO, 2009). Foi escolhida esta técnica para este trabalho pois, segundo Ferraro (2009) é uma técnica rápida, sensível e de baixo custo, eficaz para avaliar efeitos genotóxicos de substâncias a células individualizadas, permitindo a visualização de rupturas no DNA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EFLUENTE TESTADO E BIOINDICADOR

O efluente têxtil utilizado na pesquisa foi coletado em uma indústria de jeans localizada no sudoeste do estado do Paraná. Para resguardar todos os envolvidos optou-se, em comum acordo, em manter o sigilo do nome, razão social e CNPJ da empresa. Foram utilizadas amostras de efluente em sua forma bruta e tratada. O tratamento do efluente foi feito pela empresa por métodos físico-químico e biológico.

Antecipadamente foram realizados testes de verificação de toxicidade aguda do efluente têxtil na espécie animal *Rhamdia quelen*. O teste realizado foi a Cl_{50} (concentração letal que causa mortalidade de 50% dos indivíduos) a qual foi base para determinar concentrações sub-letais testada para análises de biomarcadores. Essa exposição foi feita durante quatro dias, nas concentrações de 0; 2; 4; 8, 16 e 32% para analisar qual a concentração era letal para os peixes, determinando assim a toxicidade aguda. Durante este experimento os animais foram acompanhados e os parâmetros eram aferidos, seguindo o protocolo ABNT NBR 15088 (2011). Posteriormente foram realizados bioensaios sobreagudos para testes de genotoxicidade através do ensaio cometa. Os exemplares de *Rhamdia quelen* foram adquiridos em uma piscicultura comercial, sendo todos exemplares juvenis, de ambos os sexos pensando entre 3,00 a 1,2 gramas.

4.2 BIOENSAIO SOBREAGUDO COM JUVENIS *Rhamdia quelen*

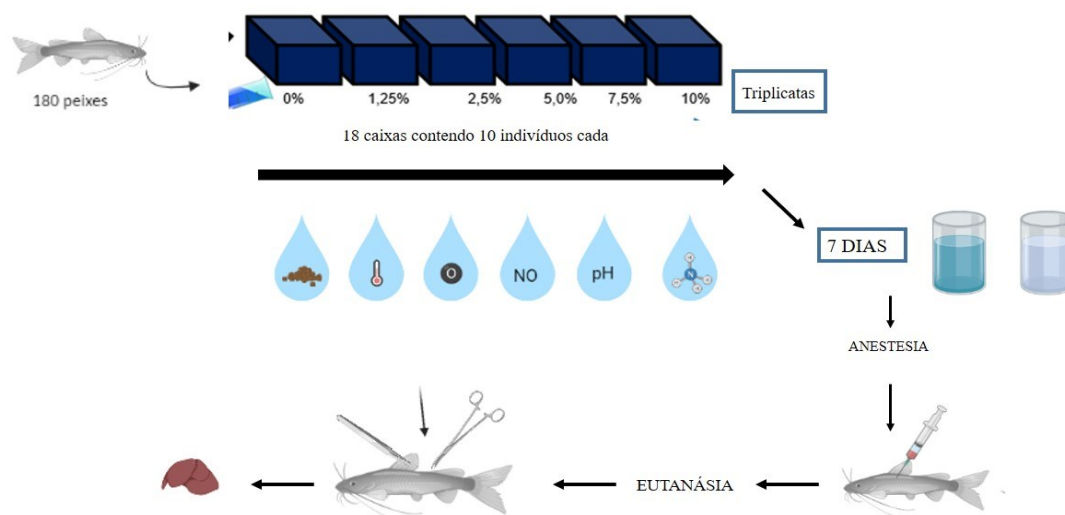
O projeto foi previamente submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEUA-UTFPR) sob protocolo de nº 2019-27 (Anexo 1). Os peixes após serem obtidos comercialmente, foram levados até a UNEPE piscicultura e conforme descrito por Tavares-Dias (2015) submetidos a um banho salino (9%) por aproximadamente 20 minutos. Em seguida foram aclimatados em condições controladas de aeração e temperatura, e alimentados duas vezes ao dia com ração controlada a 1,5% da biomassa, por um período de no máximo 15 dias.

Para diluição do efluente bruto e tratado foram utilizados os dados da CL_{50} previamente quantificado para efluente bruto. Primeiramente, 180 peixes de ambos os sexos foram aclimatados somente em água, posteriormente foram submetidos para o teste sobreagudo por

7 dias em concentrações de efluente de 1,25%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% e também o controle. Os 180 peixes foram divididos em 18 caixas de polietileno de 60 litros em grupos de 10 indivíduos, contendo 3 réplicas para cada diluições do efluente têxtil tratado. As exposições foram realizadas com efluente tratado e depois com o bruto, ambos durante 7 dias. Para cada um dos bioensaios primeiramente houve a aclimação dos peixes, seguindo as normas do protocolo descrito na NBR-5410 de 2016. O efluente foi adquirido um dia antes da exposição e mantido em sala climatizada. As diluições foram feitas diretamente na água do experimento. Os peixes alimentados uma vez ao dia com ração controlada a 1,5% da biomassa, com controle de temperatura, oxigenação e aferição dos parâmetros de nitrito, amônia e pH uma vez ao dia (figura 3).

Segundo Instrução Normativa da CONCEA (2018) ao fim das exposições os peixes foram anestesiados com cloridrato de benzocaína 100 mg/L. Foi coletado sangue por punção no coração para as análises genotóxicas e posteriormente foram submetidos a eutanásia por sobredosagem de Cloridrato de benzocaína. O fígado foi coletado de três peixes cada caixa (nove peixes por tratamento) para ensaio cometa (figura 3) e outras amostras também foram retiradas para pesquisas paralelas.

Figura 3: Bioensaio com juvenis de *Rhamdia quelen*



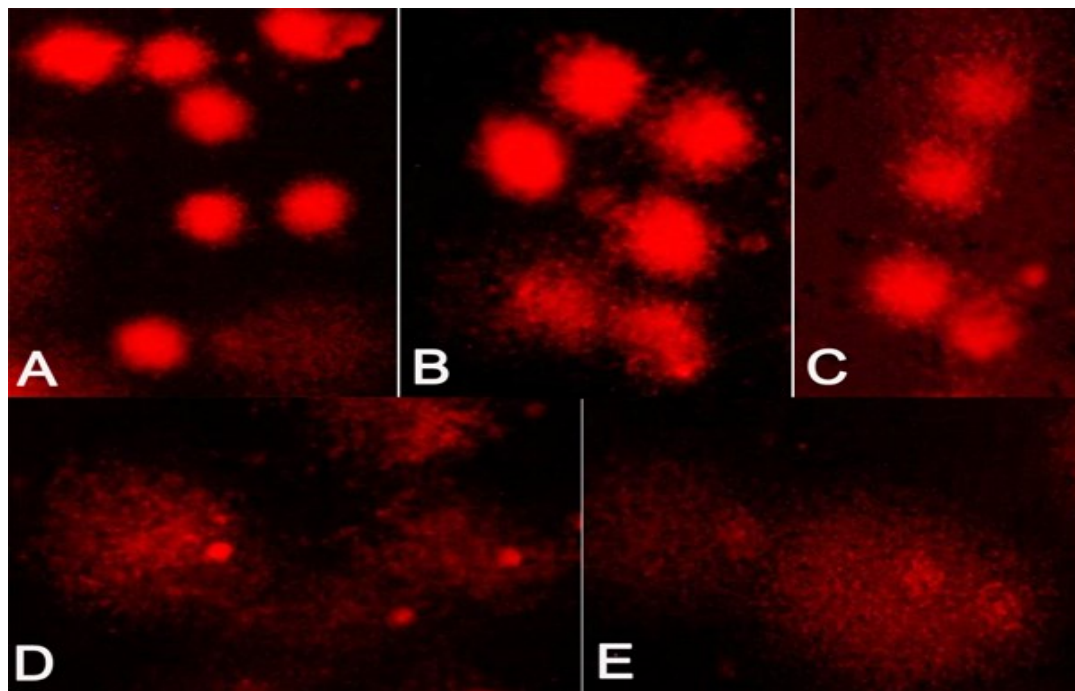
Fonte: Autoria própria

4.3 ENSAIO COMETA

Para realização do ensaio cometa as amostras foram armazenadas em soro bovino fetal e refrigeradas. As amostras de fígado foram desagregadas com o auxílio do microhomogenizador. Em seguida, as amostras tanto de fígado quanto as de sangue foram suspensas a agarose de baixo ponto de fusão e então alocadas para uma lâmina de vidro, já previamente cobertas com uma camada de agarose normal (FERRARO, 2009). Posteriormente as lâminas imersas em solução de lise permaneceram 24 horas em geladeira a 4°C, para a degradação das membranas celulares e nucleares. Em seguida foram alocadas na cuba de eletroforese horizontal cobertas por solução de NaOH e EDTA pH>13, ficaram em repouso por 25 minutos e depois, executando a eletroforese durante 30 minutos a 300mA e 25V. Na sequência da eletroforese as lâminas foram colocadas em bandejas e banhadas com solução de TRIS, por um tempo de cinco minutos, por três vezes (FERRARO, 2009).

As lâminas prontas, foram coradas a base de Brometo de etídio, o qual foi diluído 1µl em água destilada, na proporção de 120 µl, utilizando 10 µl da mistura por lâmina. Após a coloração foram analisadas, contabilizando-se 100 nucleoides por lâmina em microscopia de fluorescência. A análise foi feita em decorrência da fragmentação do DNA, em que os nucleoides com um diâmetro mais agrupado foi considerado dano 0 (sem danos) posteriormente dano1, dano 2, dano 3 e dano 4 (apoptose celular). Esta análise foi feita através do deslocamento dos fragmentos de DNA remetendo uma cauda de cometa, como exemplificada na figura 4. As análises estatísticas foram realizadas no software Statistica. Os dados foram testados quanto a sua normalidade e homoscedasticidade pelo teste de Levene's. Posteriormente foi realizado uma análise de variâncias pelo teste ANOVA para analisar os resultados e comparar os grupos pelo teste de Tukey.

FIGURA 4: Danos no DNA observados em nucleóides. A) dano 0; B) dano 1; C) dano 2; D) dano 3; E) dano4.

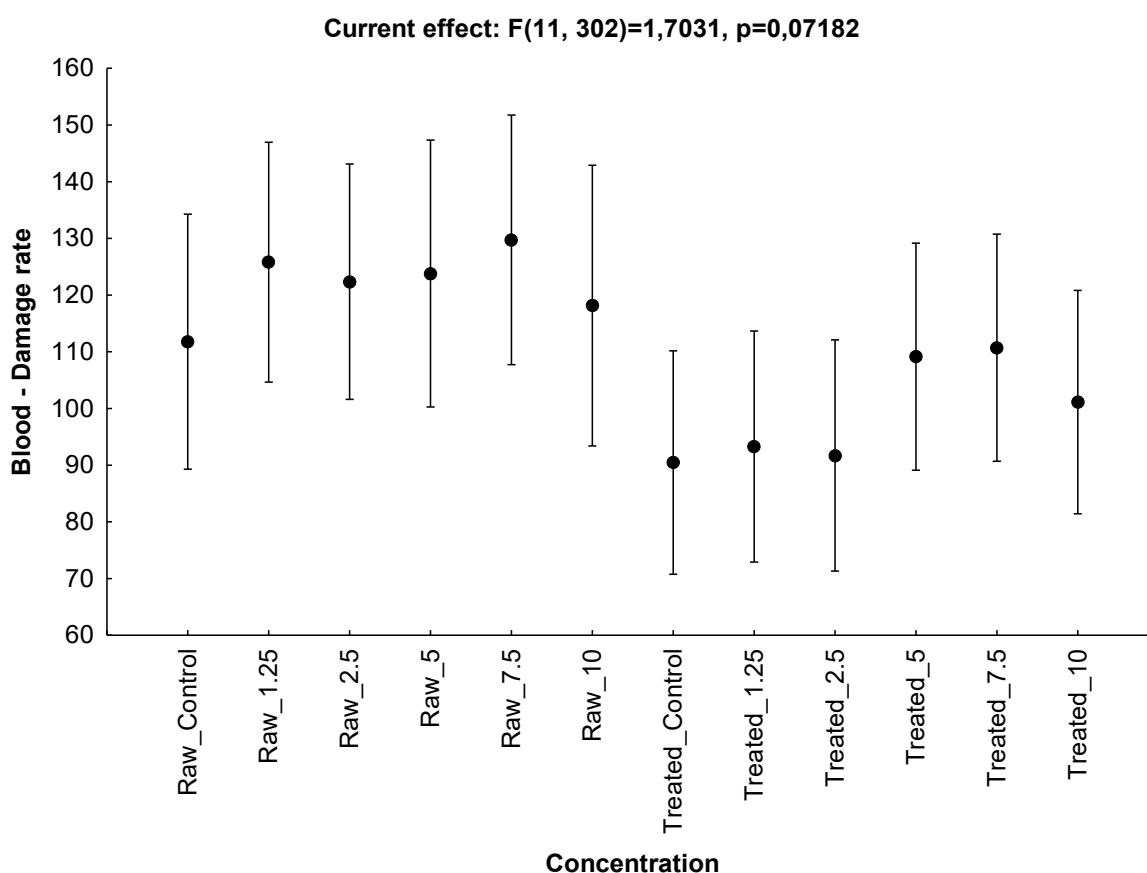


Fonte: ROQUE, (2018)

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

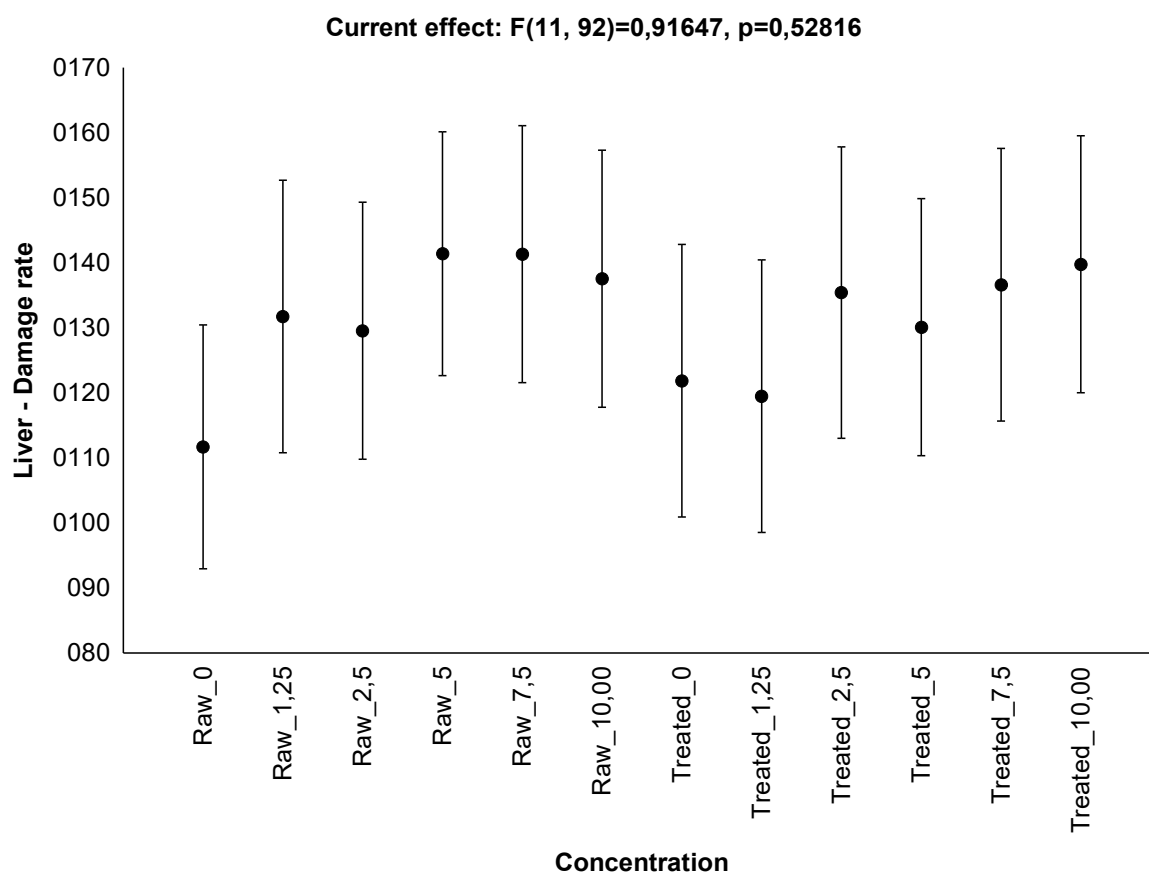
A análise dos 100 nucleoides por lâmina de eritrócitos resultou em uma diferença estatística entre o efluente bruto e o efluente tratado para eritrócitos, com um $p < 5\%$, ou seja, as diferenças estatísticas são significativas. Porém, quando observada os danos em eritrócitos entre as diluições (1,25%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% respectivamente) e o controle, não se observa diferenças significativa, tanto para efluente bruto quanto para efluente tratado, como mostra a figura 5. Os hepatócitos não apresentaram diferenças significativas entre a comparação de efluente tratado com o bruto, nem entre as diluições e controle, observado na figura 6.

Figura 5. Taxa de danos nos eritrócitos de peixes expostos a efluente têxteis bruto e tratado, avaliados pelo Ensaio cometa. Nota: Blood= sangue. Raw= efluente bruto. Treated= efluente tratado, seguidos da % de diluição do efluente (concentration 1.25%, 2.5%, 5%, 7.5% e 10%). F= Resultado da ANOVA.



Fonte: A autora (2022)

Figura 6. Taxa de danos nos hepatócitos de peixes expostos a efluente têxteis bruto e tratado, avaliados pelo Ensaio cometa. Nota: Liver= Fígado. Raw= efluente bruto. Treated= efluente tratado, seguidos da % de diluição do efluente (1,25%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10%). F= Resultado da ANOVA.



Fonte: A autora (2022)

Nas análises estatísticas apresentadas acima pode-se observar que não houve diferença significativa de danos causados ao DNA, analisado através do ensaio cometa nas diluições (diluição mais concentrada de 10%) em comparação ao controle (0% de efluente) para o efluente tratado num período de sete dias. Estudos de Hemachandra e Pathiratne, (2016) corroboram com os dados obtidos, ao avaliar a espécie de peixe *O. niloticus* exposta a concentrações de 12,5% do efluente têxtil tratado proveniente de uma indústria têxtil do Sri Lanka, que também não apresentou danos significativos comparados ao controle. Porém para o ensaio cometa de *O. niloticus* exposto ao efluente têxtil bruto apresentou danos estatisticamente significativos comparados com o controle (HEMACHANDRA; PATHIRATNE, 2016), o que de fato discorda dos dados obtidos na presente pesquisa.

Outro estudo feito por Andrade, (2004) utilizando a espécie adulta de peixe *Danio rerio*, com uma concentração de 36,4% de efluente têxtil tratado, não observou diferença significativa de danos genotóxicos em comparação com o controle em um período de exposição de 96 H. Rosa et al. (2001) utilizou a mesma concentração de efluente têxtil tratado supracitada na espécie de peixe *Poecilia reticulata* por um período de exposição de 48 horas e também não encontrando danos genotóxicos estatisticamente significativos em relação a diluição e ao controle.

O efluente bruto também não apresentou diferença significativa de danos genéticos em eritrócitos e hepatócitos entre as concentrações e controle. Já em comparação entre efluente bruto e tratado, os danos foram estatisticamente significativos para eritrócitos ($p=0,00028$) confirmando que o efluente bruto de fato causa maiores danos genotóxicos. Silva et al (2012) relata ainda que a espécie *D. rerio*, exposta a uma concentração de 20% do efluente têxtil tratado apresentaram danos entre a extensão da cauda do cometa de 0 (sem fragmentação nas fitas de DNA) até dano 1, já em comparação a exposição a efluente têxtil bruto em diluições de 20%, apresentaram aumento na cauda do cometa, apresentando aumento nos dados 3 e 4 (apoptose celular) em relação ao controle negativo. Assim, corroborando com os resultados apresentados, de que o efluente têxtil bruto causa danos mais severos ao material genético em comparação ao efluente tratado. Desta forma, ressaltando a importância da realização do tratamento do efluente têxtil descartado no ambiente, removendo a coloração que interfere na fotossíntese e demais fatores prejudiciais e reduzindo a toxicidade.

Em relação ao tempo de exposição para detecção de danos significativos, observou-se na presente pesquisa que em um período de tempo de sete dias já foi suficiente para observação de danos genotóxicos perante o efluente têxtil bruto. Já em relação ao efluente tratado em exposição de sete dias é seguro para juvenis de *R. quelen*. Çavas e Ergene-Gozukara, (2003) apontam que o potencial genotóxico de uma indústria têxtil da Turquia em concentração de 20% é observado em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* em até 3 dias. Embora encontrados fragmentações significativas no DNA de eritrócitos de *Cyprinus carpio* (carpa) em três dias ao comparar com o controle não foi verificado diferenças significativas (SUMATHI et.al, 2001).

Ao observar os danos é necessário levar em conta também a questão do estresse causado aos peixes, por saírem de seu ambiente natural e serem mantidos em ambientes controlados para a realização do experimento. É inerente a presença de interferências

externa no desenvolver do experimento, provocando alterações em seu organismo. Segundo estudos de Galhardo; Oliveira (2006) as alterações podem decorrer do estresse vindo de fontes químicas ou físicas, já que em primeiro lugar desencadeia mudanças neuroendócrinas que levam a liberação de cortisol e radicais livres que podem acarretar em estresse oxidativo. Fontes naturais também podem ser oriundas como agentes estressores, bem como o confinamento, pois o mesmo aumenta o metabolismo aeróbico, o manuseio dos animais, a cores dos tanques onde ficam confinados a hierarquia e territorialidade, medo e variação de parâmetros aquáticos, como visto nos estudos de Costenaro Ferreira (2016). Por isso, a importância de apresentar um controle negativo para cada bioensaio, onde os organismos são submetidos a todos os fatores e condições do experimento, exceto o composto tóxico. Desta forma, é possível isolar o dano ocasionado pelo poluente comparando os tratamentos com o controle.

Neste estudo foram utilizados tecidos sanguíneo/eritrócitos e do fígado/hepatócitos, pois são dois alvos de qualidade quando expostos a poluentes aquáticos, por serem sensíveis e apresentarem danos em pouco tempo de exposição. Muitos estudos trazem o fígado como um alvo muito sensível, segundo estudos de Meletti (2003) o fígado pode possuir grandes alterações em suas células e estrutura fisiológica quando em contato com poluentes tóxicos, pois o mesmo é um órgão responsável pela secreção de bile, por metabolizar substâncias, armazenar lipídios, fazer oxidação de ácidos graxos, desintoxicando o organismo e garantido a homeostase. Nos peixes, bem como os eritrócitos, os hepatócitos são propensos a apresentar efeitos em níveis molecular, pois são irrigados lentamente com fluxo sanguíneo, assim tendo um maior período de exposição (GUILOSKI, 2014). O estudo de Oliveira (2013) prediz que os efeitos genotóxicos que passam de uma célula a outra denominam-se mutação, desencadeando muitos efeitos podendo ser benéfico ou prejudicial. Segundo Silva (2004) O fígado é um órgão chave no que condiz a exposição de peixes a poluentes. De acordo com Hinton et. al (1992), devido as suas funções de desintoxicações xenobiontes a e sensibilidade aos poluentes, o fígado recebe atenção em estudos toxicológicos relacionados a contaminação de espécies aquáticas.

Eritrócitos também são apontados como um ótimo alvo, pois apresenta grandes danos a nível molecular a curtos períodos de exposição, observado na presente pesquisa, pois foi a célula que obteve maior diferença significativa nos danos causados no DNA dos eritrócitos. Segundo Seriani e Ranzani-Paiva, (2012) quando os peixes são expostos a efluentes de alta poluição ocasionam uma série de alterações dos constituintes

sanguíneos. A hematopoiese nos peixes é influenciada rapidamente por muitos fatores biológicos e ambientais, por serem desprovidos de medulas óssea, tem menor complexidade, e acarretam em maiores danos quando submetidos a condições endógenas ou exógenas (GABRIEL et al. 2004; RANZANI -PAIVA et al. 2005; TAVARES DIAS et al. 2007; BARROS et al. 2009; SERIANE et al. 2010). Quando expostos a alterações na qualidade ambiental, produzem níveis de estresses, apresentam interferência na sua atividade homeopática a qual acarreta na alteração morfológica sanguínea, bem como danos ao material genético dos eritrócitos. Por isso, análises genotóxicas em peixes expostos a efluentes podem ser consideradas de boa qualidade, sensíveis e rápidas no sentido de monitoramento dos ecossistemas aquáticos (KIRSCHBAUM et al., 2009; SERIANE et al., 2010, 2011, 2012; MONTENEGRO & GONZALEZ, 2012; AZEVEDO et al., 2012).

No presente trabalho o fígado não apresentou danos genéticos, enquanto os eritrócitos apresentaram, embora muitos estudos trazem o fígado como um dos órgãos mais sensíveis quando expostos a poluentes. No entanto, a partir do comportamento dos hepatócitos neste trabalho, pode-se pressupor de que o tecido hepático não seja tão sensível quando exposto a efluente têxtil proveniente do jeans. Já os eritrócitos apresentaram-se como células mais sensíveis a este tipo de efluente. Em outros estudos do grupo da presente pesquisa analisou-se os micronúcleos e alterações morfológicas nucleares nos mesmos animais, o qual de modo geral não apresentou danos significativos entre as concentrações e o controle, e nem em comparação entre o efluente bruto e tratado. Com isto, são recomendados mais estudos em vias moleculares ou bioquímicas para corroborar ou rejeitar esta hipótese, visto que exposições maiores ao efluente têxtil bruto pode apresentar danos não observados nesta pesquisa, pois o efeito do efluente bruto na oxigenação não foi avaliado, pois em ambiente natural os peixes podem vir a apresentar maiores danos devido a oxigenação ser mais limitada pela coloração do efluente.

6. CONCLUSÃO

Com a análise realizada, pode-se concluir que o efluente bruto causou danos genotóxicos para as células sanguíneas significativamente maiores que o efluente tratado. Para as células hepáticas não observou-se diferença de danos entre o efluente tratado e bruto, com isso pode-se estudar mais a fundo o pressuposto de que células sanguíneas sejam mais sensíveis a exposição de agentes poluentes do que as células hepáticas, por conta de suas diferentes funções no organismo, justificando a ausência de diferença de danos entre as células.

Não houve diferença significativa entre as diluições e o controle negativo, tanto para o efluente bruto quanto para o efluente tratado em um período experimental de sete dias. O tratamento reduz o potencial de efeito genotóxico e em concentração <10% o efluente tratado foi seguro para espécies juvenis de *Rhamdia quelen* por um período de sete dias, ressaltando a importância do tratamento para efluentes têxteis. Aconselha-se como perspectiva futura a realização de bioensaios com maior tempo de exposição e para outras idades de *R. quelen* para confirmar de fato se o tratamento é eficaz e não causa mutagênese aos demais níveis. Recomendam-se também avaliações em outros biomarcadores e respostas integrativas de toxicidade aos organismos animais, bem como a outros grupos de organismos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **NBR 5410**: Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica de curta duração — Método de ensaio com peixes. Brasil, 2016.

Ambiente-CONAMA. Ministério do Meio Ambiente, Brasil, 2011. Disponível em: <<http://www.mpf.mp.br/atuacao-tematica/ccr4/dados-da-atuacao/projetos/qualidade-da-agua/legislacao/resolucoes/resolucao-conama-no-430-de-13-de-maio-de-2011/view#:~:text=Disp%C3%B5e%20sobre%20as%20condi%C3%A7%C3%B5es%20e,Nacional%20do%20Meio%20Ambiente%2DCONAMA>> Acesso em: 04 ago. 2021

ANDREDE, Rui Miguel Sanches Linhares. **Efeitos da exposição de peixe zebra, *Danio rerio*, a um efluente têxtil**. 2004. Tese (Mestrado ecologia aplicada) - Faculdade de Ciências da Universidade do Portf, [S. l.], 2004.

ARAUJO, F. V. F.; YOKOYAMA, I. **Remoção de Cor em soluções de corantes reativos por oxidação com H₂O₂/UV**. Química Nova, Vol. 29, No. 1, 11- 14, 2006.

AZEVEDO, J. DE S.; BRAGA, E. DE S.; RIBEIRO, C. A. O. Nuclear abnormalities in erythrocytes and morphometric indices of catfish *Cathorops spixii* (Ariidae) of different sites on the southeast coast of Brazil. Braz. j . **Oceanography**. Vol.60, 2012.

BANAT, I. M. et al. **Microbial Decolorization of Textile Dye-Containing Effluents: A Review**. Bioresour. Technol., 58, 217. 1996

BARROS, M.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T; PEZZATO, L.E.; FALCON. D. R.; GUIMARÃES, I. G. Hematological response and growth performance of Nile tilapia fed diets containing folic acid. **Aquaculture Research**, Vol.40, p. 895-903, 2009.

ÇAVALO, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 538, n. 1–2, p. 81–91, 8 Jul. 2003.

CIRRA – Centro Internacional de Referência em Reuso de Água; FCTH – Fundação Centro Tecnológico de Hidráulica. Conservação e Reuso de água – **Manual de Orientações para o Setor Industrial**. v. 1. São Paulo: FIESP e CIESP, 2004

CNI (Confederação Nacional da Indústria); ABIT (Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecções). **O Setor Têxtil e de Confecção e os Desafios da Sustentabilidade**. Brasília, 2017. Disponível em: <https://bucket-gw-cni-static-cms.s3.amazonaws.com/media/filer_public/bb/6f/bb6fdd8d-8201-41ca-981d-deef4f58461f/abit.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2021.

CONAMA. **Resolução Conama n. 001 de 23 de Janeiro de 1986**. Dispõe sobre critérios básicos e diretrizes gerais para a avaliação de impacto ambiental. Alterada pela Resolução nº 11/86 (alterado o art. 2o). Alterada pela Resolução no 5/87 (acrescentado o inciso XVIII). Alterada pela Resolução nº 237/97 (revogados os art. 3o e 7o). Ministério do Meio Ambiente, Brasil, 1986. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legislacao/CONAMA_RES_CONS_1986_001.pdf>. Acesso em: 03 ago.2021

CONCEA. **Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA Diário Oficial da União de 22/02/2018 (nº 36, Seção 1, pág. 5)**. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, Brasil, 2018. Disponível em: <https://ceua.ufop.br/sites/default/files/ceua/files/resolucao-normativa-n-37-diretriz-da-pratica-de-eutanasia_site-concea.pdf?m=1534249510>. Acesso em: 7 ago 2021.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Resolução nº237, de 19 de dezembro de 1997. **Licenciamento ambiental; competência da União, Estados e Municípios; listagem de atividades sujeitas ao licenciamento; Estudos Ambientais, Estudo de Impacto Ambiental e Relatório de Impacto Ambiental**. 1997.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Resolução nº430, de 13 de maio de 2011. **Condições e padrões de lançamento de efluentes**. 2011.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, [S.I.], v. 31, n. 7, p. 1820–1830, jan. 2008

COSTENARO-FERREIRA, C. **DESEMPENHO E COMPORTAMENTO DE LARVAS E ALEVINOS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) EM CONFINAMENTO**. [s.l.] Universidade Federal de Pelotas, 2016.

DE MENEZES, C. C. et al. Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, [S.I.], v. 60, n. 4, p. 665–671, mai. 2011.

E. BERTOLETTI **Controle Ecotoxicológico de Efluentes Líquidos no Estado de São Paulo**. 2. ed. São Paulo: CETESB, 2008.

FERRARO, M. V. M. et al. **Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests**. *Genetics and Molecular Biology*, v. 27, n. 1, p. 103–107, 2004.

FERRARO, M. V. M. **Avaliação de três espécies de peixes - *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos**. 2009. 189 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

GABRIEL, U.U.; EZERI, G.N.O.; OPABUNMI, O.O. Influence of sex, source, health status and acclimation on the haematology of *Clarias gariepinus* (Burch, 1822). *African Journal of Biotechnology*. Vol.3, p.463-467, 2004.

GALHARDO, L.; OLIVEIRA, R. Bem-estar Animal: um Conceito Legítimo para Peixes? *Revista de Etologia*, v. 8, p. 51–61, 2006.

GOMES, L. DE C. et al. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 179–185, 2000.

GUILOSKI, I. C. **EFEITOS BIOQUÍMICOS, GENÉTICOS, HEMATOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E REPRODUTIVOS DOS MICROPOLUENTES DICLOFENACO E PARACETAMOL EM *Rhamdia quelen* (PISCES, TELEOSTEI)**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2014.

HASSEMER, M. E. N. **Oxidação Fotoquímica - UV/H₂O₂ – Para Degradação de Poluentes em Efluentes da Indústria Têxtil**. 2006. 175 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

HEMACHANDRA, C. K.; PATHIRATNE, A. Combination of physico-chemical analysis, *Allium cepa* test system and *Oreochromis niloticus* erythrocyte based comet assay/nuclear abnormalities tests for cyto-genotoxicity assessments of treated effluents discharged from textile industries. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 131, p. 54–64, 2016.

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A.; OKIHIRO, M. S. Histopathologic Biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. cap. 4, p. 155 –196.

HODGSON, E. Introduction to Toxicology. In: _____. **A Textbook Of Modern Toxicology**. 3. ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2004a. p. 3–12.

ISLAS-FLORES, H. et al. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S.l.], v. 92, [S.n.], p. 32–38, Jun. 2013.

KIRSCHBAUM, A. A.; SERIANI, R.; PEREIRA, C. D.S.; ASSUNÇÃO, A.; ABESSA, D. M. de S.; ROTUNDO, M. M.; RANZANI-PAIVA M. J.T. Cytogenotoxicity biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, SP, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. Vol. 32, p. 151-154, 2009.

LOSEKANN, M. E. et al. Alimentação do jundiá com dietas contendo óleos de arroz, canola ou soja. *Ciência Rural*, v. 38, n. 1, p. 225–230, 2008.

MAGALHÃES, D. DE P.; FERRÃO FILHO, A. DA S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, Manginhos, v. 12, n. 3, p. 355–381, 2008.

MELETTI, P. C.; ROCHA, O.; MARTINEZ, C. B. R. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. In: BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E. L. G. (Org.). *Limnologia Fluvial - Um Estudo no Rio Mogi-Guaçu*. São Carlos, 2003, p. 149-180

MERZOUK, B. et al. **Removal of a disperse red dye from synthetic wastewater by chemical coagulation and continuous electrocoagulation: A comparative study**. **Desalination**, v. 272, p. 246-253, 2011.

MONTENEGRO D. & GONZÁLEZ M. T. Evaluation of somatic indices, histopathology, hematology and liver of the fish *Philippiiila brisomus* San Jorge Bay,

northern Chile as associated with environmental stress. **Revista de Biología Marina y Oceanography**. Vol. 47, p. 99-107, 2012.

NUNES, GIOVANNA. Corantes. *In*: NUNES, GIOVANNA. **GERAÇÃO E TRATAMENTO DE EFLUENTES DA INDÚSTRIA TÊXTIL**. 2019. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, [S. l.], 2019. Disponível em: https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/30898/1/GeracaoTratamentoEfluente_s.pdf. Acesso em: 4 ago. 2021.

OLIVEIRA, G. A. R. DE. **Avaliação toxicogenética e ecotoxicológica de corantes têxteis**. [s.l.] Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, 2013.

RANZANI-PAIVA, M. J. T; FELIZARDO, N. N.; LUQUE, J. L. Parasitological and hematological analysis of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757, from Guarapiranga Reservoir, São Paulo State, Brazil. **Acta Scientiarum, Biological Science**, Vol. 27, p. 231-237, 2005.

REVANKAR, M. S.; LELE, S. S. **Synthetic dye decolorization by Ganoderma sp. WR-1**. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 775-780, 2007.

ROQUE, A. de A. **Biomarcadores Genéticos para avaliação dos efeitos do herbicida 2,4-D (Ácido 2,4- Diclorofenoxiacético) sobre o peixe nativo *Rhamdia quelen***. 2018. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2018.

ROSA, E. V. C, SIMIONATTO, E. L., SIERRA, M. M. S., BERTOLI, S. L. & RADETSKI, C. M., 2001. Toxicity-based criteria for the evaluation of textile wastewater treatment efficiency. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20 (4): 839-845.

SERIANI, R.; MOREIRA, L. B.; ABESSA, D. M. S.; MARANHO, L. A.; ABUJAMARA, L. D.; CARVALHO, N. S. B.; KIRSCHBAUM, A. A.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Hematological analysis in *Micropogonias furnieri* Desmarest, 1823, Scianidae, from two estuaries of Baixada Santista, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**. Vol. 58, p. 87-92, 2010.

SERIANI, R. & RANZANI-PAIVA, M.J.T. Alterações hematológicas em peixes: Aspectos fisiopatológicos e aplicações em ecotoxicologia aquática *In*: SILVA-

SOUZA, A.T.; PEREZ LIZAMA, M. A.; TAKEMTO, R.M. (Org). **Patologia e sanidade de organismos aquáticos**. Maringá: ABRAPOA, p.221-242, 2012.

SILVA , Elyara Maria Pereira *et al.* Atividade da catalase e da lactato desidrogenase em tilápias submetidas a estresse de confinamento: efeito da cor do ambiente. **SciELO**, [S. l.], p. 896-898, 15 maio 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/9nw6H37VNrt8kML4RHZLPYt/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 6 jun. 2022.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

SUMATHI, M. et al. Genotoxicity of Textile Dye Effluent on Fish (*Cyprinus carpio*) Measured Using the Comet Assay. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v 66, p. 407-414, 2001.

TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A.; PILARSKI, F.; MORAES, F. R. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish acytochemical study and ultrastructural analysis. **Journal of Applied Ichthyology**. Vol..23, p.709-712, 2007.

TOPRAK, T.; ANIS, P. Textile industry's environmental effects and approaching cleaner production and sustainability, an overview. **Journal of Textile Engineering & Fashion Technology**. [S.l.], v. 2, n. 4, p. 429-442, ago. 2017.

WEISBURGER, J. H. Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, [S.l.], v. 437, n. 2, p. 105–112, set. 1999.