Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

RAÍSSA SANTOS FERRARI

**Quantificação de PBDEs em amostras de sedimentos de
Ribeirão Preto e avaliação da toxicidade do BDE-209 em
células HepG2 sob influência de indução autofágica.**

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área de Concentração: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP
2016

Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**Quantificação de PBDEs em amostras de sedimentos de
Ribeirão Preto e avaliação da toxicidade do BDE-209 em
células HepG2 sob influência de indução autofágica.**

Versão corrigida dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. A versão original encontra-se disponível na unidade que aloja o programa de pós-graduação em Química.

Área de Concentração: Química

Orientado: Raíssa Santos Ferrari

Orientador: Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta

RIBEIRÃO PRETO -SP
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL
DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU
ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE
CITADA A FONTE

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferrari, Raíssa Santos

Quantificação de PBDEs em amostras de sedimentos de Ribeirão Preto e avaliação da toxicidade do BDE-209 em células HepG2 sob influência de indução autofágica, 2016.

p. 77 : il. ; 30 cm

Versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa de pós-graduação em Química

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Química.

Orientador: Dorta, Daniel Junqueira

1. PBDEs 2. Toxicologia 3. Autofagia 4. Quantificação em sedimentos 5. Cromatografia Gasosa.

FOLHA DE APROVAÇÃO

RAÍSSA SANTOS FERRARI

Quantificação de PBDEs em amostras de sedimentos de Ribeirão Preto e avaliação da toxicidade do BDE-209 em células HepG2 sob influência de indução autofágica.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências
Área de Concentração: Química

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

O caminho dos paradoxos é o caminho da verdade.

Oscar Wilde

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta**, meu orientador, pela oportunidade dada, na qual pude dividir conhecimento e me desenvolver como profissional; pela paciência e apoio nos momentos de dificuldades; pela personalidade acolhedora e simpática que ele mantém com seus alunos.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto**, bem como a todos os **professores, técnicos e funcionários**, que contribuíram para o desenvolvimento deste mestrado.

À **Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto, FCFRP**, e seus funcionários pelo auxílio prestado em vários âmbitos desse projeto.

Às **Agências de Fomento**, Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Pesquisa (CNPQ) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Ao **Prof. Dr. Fernando Sodré** e seu doutorando **Daniel Annuniação**, do Instituto de Química da Universidade de Brasília (UnB) pela parceria e auxílio prestado na elaboração da análise de sedimentos desse projeto através do método desenvolvido por eles.

À **CETESB** pela disponibilidade em nos ajudar na coleta de sedimentos da Lagoa do Saibro.

Ao nosso IC **Raul**, que me acompanhou em grande parte desse projeto, cuja ajuda foi imprescindível e cujo companheirismo tornou tudo mais agradável.

A **minha família**, a quem devo tudo em minha vida, pelo constante apoio em minhas conquistas, ao amor e carinho incondicional, ao esforço em me oferecer as melhores oportunidades, à orientação e por simplesmente serem quem são.

A **Maísa**, quem literalmente me acompanhou em todos os momentos desse mestrado, cuja personalidade compromissada e esforçada me serviu de exemplo para sempre fazer o meu melhor; pela amizade e momentos compartilhados; por permitir apoiar-me em você.

A **Maria Júlia**, com quem dividi todas as experiências acadêmicas desde o início. Agradeço pelo companheirismo todos esses anos e pela oportunidade que tivemos de crescermos como pessoas juntas.

Aos companheiros de laboratório **Alana, Alecsandra, Barbara, Lilian, Mariana e Murilo** pelo conhecimento e experiências compartilhados, auxiliando no meu desenvolvimento acadêmico; pelos momentos de descontração, risadas e companheirismo que tornaram a caminhada ainda mais prazerosa.

RESUMO

Ferrari, R. S. **Quantificação de PBDEs em amostras de sedimentos de Ribeirão Preto e avaliação da toxicidade do BDE-209 em células HepG2 sob influência de indução autofágica.** 2016. 76 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Os éteres difenílicos polibromados (PBDEs) são compostos amplamente utilizados como retardantes de chamas que foram introduzidos por volta da década de 1970, em uma gama de produtos industrializados, especialmente em aparelhos eletrônicos. No entanto, em contrapartida ao seu papel benéfico como dispositivo de segurança, esses compostos apresentam uma estrutura química que proporciona ao homem preocupantes efeitos tóxicos que, de acordo com vários estudos, são responsáveis por desencadear problemas neurotóxicos e hormonais, assim como influenciarem no desenvolvimento de algumas doenças. Além disso, suas características físico-químicas permitem que eles sejam bioacumulados e persistentes no meio ambiente. Diante desses fatores, tornam-se importantes estudos que melhor caracterizem o mecanismo de ação desses compostos e, portanto, a proposta do projeto foi analisar os efeitos do congênere 2, 2' ,3, 3' ,4, 4' ,5, 5' ,6, 6' decabromodifenil éter (BDE-209) em células de hepatocarcinoma humano do tipo HepG2, aplicando como método de análise os ensaios de citotoxicidade durante indução autofágica. Os resultados obtidos mostraram que o BDE-209, como observados em outros estudos do nosso laboratório, não apresentou toxicidade acentuada em comparação aos outros congêneres, pois mostrou resultados significativos apenas nas maiores concentrações. A indução autofágica, por sua vez, não proporcionou efeitos protetivos contra a citotoxicidade do BDE, pelo contrário, ela foi capaz de perturbar ainda mais a homeostasia celular e de causar necrose na presença de 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do congênere. Suplementariamente, foram coletadas amostras de sedimentos provenientes de uma lagoa pertencente à área de recarga do aquífero Guaraní no município de Ribeirão Preto para a quantificação de PBDEs com o objetivo de determinar o nível de contaminação desse ambiente. Estas amostras foram analisadas por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG-ECD), após um processo

de extração, clean up e pré-concentração. Os resultados obtidos mostraram a presença de seis BDEs com somatórias de suas concentrações nos valores de 4,03 ng.g⁻¹ e 5,38 ng.g⁻¹ em duas amostras coletas, tendo como congênere em destaque o 2, 2', 4, 4' tetrabromodifenil éter (BDE-47).

Palavras-chave: PBDE, toxicologia, autofagia, quantificação em sedimento, cromatografia gasosa.

ABSTRACT

Ferrari, R. S. **Quantification of PBDEs in sediments samples of Ribeirão Preto and evaluation of toxicity of BDE-209 in HepG2 cells under autophagy induction.** 2016. 76 p. Dissertation (Master degree) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

The polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are compounds widely used as flame retardants, introduced around 1970, in a diversity industrial products especially electronics. However, in contrast to its beneficial role as a safety device, these compounds have a chemical structure, which provides to humans worrisome toxic effects, because according to several studies, they are responsible for triggering neurotoxic and hormonal problems, as well as influence in the development of some diseases. Moreover, its chemical composition allows them to be bioaccumulated, which gives potential effects, since they are persistent in the environment. Given these factors, studies that can better describe these compounds' action mechanism are important. Therefore, the proposal of this project was to analyze the effect of 2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 5', 6, 6'-decabromodiphenyl ether (BDE-209) using as model the human hepatocellular carcinoma cells, HepG2, applying cytotoxicity assays during autophagic induction. The results showed that BDE-209, as observed in other studies of our group, induced no severe toxicity like other congeners as it showed significant results only in higher concentrations. The autophagic induction had no protective effects against the BDE's cytotoxicity, on the contrary, it was able to affect cell's homeostasis and cause necrosis in the presence of 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ of the congener. Additionally, sediment samples were collected from a recharge point of Guaraní aquifer in Ribeirão Preto for quantification of these compounds to determine the level of contamination in this environment. These samples were analyzed by gas chromatography with electron capture detector (CG-ECD) after a process of extraction, clean up and preconcentration. The results showed the presence of six BDEs with total concentration of 4.03 ng.g^{-1} and 5.38 ng.g^{-1} in two samples collected, which the main congener was 2, 2', 4, 4' tetrabromodiphenyl ether (BDE-47).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura básica dos éteres difenílicos polibromados (PBDEs) e das bifenilas policloradas (PCBs), respectivamente.....	4
Figura 2 - Reações químicas envolvidas na transformação dos PBDEs em PBDD/Fs e PXDD/Fs.	6
Figura 3 - Estrutura química dos metabolitos gerados a partir dos PBDEs em comparação ao hormônio tireoidiano T4, respectivamente.....	8
Figura 4 - Estrutura do congênere 209, avaliado nesse projeto.	10
Figura 5 – Representação geográfica e espacial dos pontos de amostragem de sedimentos para as análises de quantificação de PBDEs em sedimentos.	11
Figura 6 - Via intrínseca e extrínseca da apoptose.....	15
Figura 7 - Cascata sinalizadora de autofagia.....	18
Figura 8 – “Crosstalk” entre apoptose e autofagia	19
Figura 9 - Separação cromatográfica da solução padrão de PBDEs.	33
Figura 10 - Cromatograma da amostra 2.....	33
Figura 11 - Cromatograma da amostra 3.....	33
Figura 12 - Comparação do efeito causado pela presença de rapamicina na toxicidade do BDE-209 em relação a proliferação das células HepG2 após 24 e 48 horas de incubação.	38
Figura 13 - Comparação do efeito causado pela presença de rapamicina na toxicidade do BDE-209 em relação a viabilidade das células HepG2 após 24 e 48 horas de incubação.	39
Figura 14 - Efeito da indução autofágica em relação a toxidade do BDE-209 em causar fragmentação ou condensação nuclear após tempos de exposição de 24 e 48 horas.....	40
Figura 15 - Característica morfológica de células fragmentadas e condensadas.....	41
Figura 16 - Efeito da rapamicina e do BDE-209 sobre o ciclo celular das HepG2 em 24 horas de exposição.	44

Figura 17 - Efeito da rapamicina e do BDE-209 sobre o ciclo celular das HepG2 em 48 horas de exposição.	44
Figura 18 - Exposição da fosfatidilserina a face externa da membrana celular e a incorporação de PI após tempo de exposição de 48 horas.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade dos principais congêneres presente nas misturas comerciais de PBDEs (EPA, 2010).....	3
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas das misturas de PBDE (ATSDR, 2015).....	5
Tabela 3 - Programa de temperatura do forno	24
Tabela 4 - Linearidade.....	25
Tabela 5 - Limites de detecção e quantificação (ng.g^{-1}).....	25
Tabela 6 - Valores de recuperação das amostras fortificadas.....	26
Tabela 7 - Recuperação entre dias	27
Tabela 8 – Concentração de PBDEs encontrados nas amostras de sedimentos da Lagoa do Saibro – Ribeirão Preto.	32
Tabela 9 - Comparação entre as concentrações de PBDEs (ng/g dw) encontradas em Ribeirão com as de outras regiões do mundo - Adaptado de Wang et al., 2015.	35
Tabela 10 - Concentrações de PBDEs encontradas em mamíferos marinhos (ng/g lipídio) - Adaptado de Hites, 2004.....	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Abs: absorbância

AIF: fator indutor de apoptose ("*apoptosis inducing factor*")

APAF-1: fator de ativação da protease apoptótica 1 ("*Apoptotic protease activating factor 1*")

ATP: adenosina trifosfato

BFRs: retardantes de chamas bromados

PCBs bifenilas policloradas

CCCP: carbonilcianeto-*m*-clorofenil-hidrazona

c-DDP: cisplatina

CDK1: quinase dependente de ciclina 1 ("*cycline-dependent kinase 1*")

CM-H2DCFDA: 5,6-clorometil-2',7'-diclorodi-hidrofluoresceína diacetato acetil-éster

MEM: *Minimun Essential Medium*

DISC: complexo de sinalização indutor de morte ("*Death Inducing Signalling Complex*")

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico ("*deoxyribonucleic acid*")

EROs: espécies reativas

FADD: domínio de morte associado ao Fas ("*Fas associated death domain*")

FAS: receptor de morte Fas na superfície celular ("*Fas cell surface death receptor*")

FITC: ficoeritrina

HBCD: hexabromociclododecano

HFS: solução de alta fluorescência ("*high fluorescence solution*")

Hoechst 33342: 2'-(4-Etoxifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-tri-hidrocloreto de 2,5'-bi-1H-benzimidazol

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

PBBs: bifenilas polibromadas

PBDEs: éteres difenílicos polibromados

PBS: solução de tampão fosfato / solução salina tamponada ("*phosphate buffered saline*")

PCBs: bifenilas policloradas

PI: iodeto de propídeo

PMM: potencial de membrana mitocondrial

RNase: ribonuclease A

rTNF: receptores de fatores de necrose tumoral ("*tumor necrosis factor receptor*")

SBF: soro bovino fetal

SRB: sulforodamina B

T3: triiodotironina

T4: tiroxina

T-BOOH: terc-butil hidroperóxido

TBBPA: tetrabromobisfenol A

TMRM: tetrametilrodamina metil éster

TNF: fator de necrose tumoral ("*tumor necrosis factor*")

TRAIL: ligante indutor de apoptose dependente de fator de necrose tumoral ("*TNF-related apoptosis-inducing ligand*")

Tris: tris-(hidroximetil)-aminometano

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Éteres difenílicos polibromados e os retardantes de chamas.....	1
1.2. Características físico-químicas dos PBDEs.	3
1.3. Efeitos toxicológicos observados	7
1.4. Congênere BDE-209	9
1.5. Método de quantificação em sedimentos e local de amostragem.....	10
1.6. Morte Celular	11
1.6.1. Apoptose	13
1.6.1.1. Processo Apoptótico	13
1.6.2. Necrose.....	12
1.6.3. Autofagia.....	16
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. Reagentes	21
3.1.1. Quantificação nos sedimentos	21
3.1.2. Análises toxicológicas	21
3.2. Quantificação das amostras de sedimentos	22
3.2.1. Limpeza de vidrarias para determinação analítica de orgânicos em níveis traço	22
3.2.1.1. Método por Ultrassom	22
3.2.1.2. Método por Calcinação.....	22
3.2.1.3. Método por Solvente	22
3.2.2. Amostragem e preparação das amostras	23
3.2.3. Metodologia de Extração.....	23
3.2.4. Método Instrumental	24
3.2.4.1. Validação do método.....	24
3.3. Estudos toxicológicos em células HepG2.....	27
3.3.1. Cultivo de células	27
3.3.2. Incubação com o congênere.....	28
3.3.3. Proliferação celular.....	28
3.3.4. Viabilidade Celular.....	29
3.3.5. Condensação e Fragmentação nuclear	29

3.3.6.	Exposição de fosfatidil serina na face externa da membrana celular (Anexina V/FITC - PI)	30
3.3.7.	Ciclo Celular	30
3.3.8.	Análise estatística	31
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.2.	Análise toxicológica do BDE-209 na presença e ausência de rapamicina.	36
4.2.1.	Proliferação celular.....	37
4.2.2.	Viabilidade Celular (MTT).....	38
5.	CONCLUSÃO	47
6.	BIBLIOGRAFIA.....	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. Éteres difenílicos polibromados e os retardantes de chamas

O grande avanço tecnológico no último século e o consequente aumento de aquisição e produção dos mais variados bens de consumo, desencadearam uma maciça geração de lixo e resíduos. Tal situação, levou os éteres difenílicos polibromados (PBDEs) a ganharem notoriedade nas últimas décadas, devido aos seus efeitos tóxicos e a sua intensiva aplicação. Eles pertencem ao grupo de retardantes de chamas bromados (BFRs), que foram introduzidos por volta de 1970 como uma alternativa, após o banimento do uso de outros retardantes de chamas, tais como as bifenilas policloradas (PCBs) e as bifenilas polibromadas (PBBs) (WHO, 1994^a; KRÓL, ZABIEGAŁA, NAMIESNIK, 2012).

Os retardantes de chamas são aplicados como sistema de segurança para retardar, suprimir ou inibir o processo de combustão, reduzindo assim os riscos de incêndios (DAUBIÉ *et al.*, 2011). Eles são empregados em aparelhos eletrônicos, como televisores e computadores, em placas de circuitos, cabos, componentes de automóveis, materiais de construção e na indústria têxtil (DE WIT, 2002; HYÖTYLÄINEN, HARTONEN, 2002; SEGEV, KUSHMARO, BRENNER, 2009). Comercialmente, existem mais de 175 tipos de compostos empregados como retardantes de chama, sendo uma parte significativa, representada pelos bromados, dos quais destacam-se os tetrabromobisfenol A (TBBPA), os hexabromociclododecano (HBCD) e os éteres difenílicos polibromados (PBDEs). (BIRNBAUM, STASKAL, 2004).

A vasta utilização dos composto bromados para esses fins deve-se às características químicas do bromo, como sua afinidade eletrônica, que oferecem maior eficiência, além de ser um elemento com baixo custo de mercado. Deste modo, estima-se uma produção de mais de 200 mil toneladas por ano de retardantes de chamas, dos quais mais da metade é consumida pela Ásia, em especial pela China (BIRNBAUM, STASKAL, 2004; HYÖTYLÄINEN, HARTONEN, 2002; ZHANG, BUEKENS, LI, 2016). Essa tendência pode ser explicada tanto pelo acelerado crescimento industrial da

região, quanto pelo fato dos países europeus e norte-americano terem proibido, ao longo dos últimos anos, a produção e comercialização de muitos desses compostos (YU *et al.*, 2016).

Em geral, os retardantes de chamas podem ser classificados como inorgânicos, orgânicos não reativos, orgânicos reativos e intumescentes. Ao primeiro grupo pertencem certos compostos borados e o hidróxido de alumínio, que quando adicionados ao material alvo formam uma película protetora. Já os pertencentes ao segundo e terceiro grupo são em sua maioria halogenados ou compostos de fósforo que se incorporam à matriz polimérica. No entanto, os orgânicos reativos se diferenciam por realizarem uma reação química com os polímeros e não apenas uma incorporação. Por último, os intumescentes formam uma camada de carbono que interfere na etapa de combustão e diminui a liberação dos gases formados neste processo (GALLO, AGNELLI, 1998; LEVCHIK, WEIL, 2007; ZHANG, HARROCKS, 2003).

Os PBDEs, por sua vez, pertencem ao grupo dos retardantes de chamas orgânicos não reativos, que atuam na neutralização dos radicais livres formados durante a combustão, interferindo assim, na reação em cadeia que rege este processo (**Equações de 1 a 5**).

em que **R** – radical orgânico; **X** – halogênio

Eles são produzidos e comercializados na forma de misturas, sendo as principais a pentaBDE, usada em estofados e móveis, a octBDE e a decaBDE, ambas muito utilizadas na produção de variados tipos de polímeros e eletrônicos. Seus nomes fazem referência ao número de substituições do congênere encontrado em maior quantidade e são fabricados com concentrações específicas de cada congênere, como ilustrado na tabela abaixo.

Tabela 1 - Quantidade dos principais congênere presente nas misturas comerciais de PBDEs (EPA, 2010).

Congênere	PentaBDE	OctaBDE	DecaBDE
BDE 47	25-37%		
BDE 99	35-50%		
BDE 100	6-10%		
BDE 153	3-5%	5-10%	
BDE 154	2-4%	1-5%	
BDE 183		40%	
BDE 196		8%	
BDE 197		21%	
BDE 203		5-35%	
BDE 206			2,2%
BDE 207		7%	0,24%
BDE 208		10%	0,06%
BDE 209			97%

Os valores representam porcentagem de peso de cada congênere.

1.2. Características físico-químicas dos PBDEs.

Em contrapartida aos efeitos benéficos dos PBDEs na área de segurança, constatou-se potenciais efeitos negativos à saúde pública e ambiental. Em decorrência de sua estrutura química, muito semelhante às das bifenilas, seus efeitos toxicológicos mostraram-se comparavelmente alarmantes. Estruturalmente, os PBDEs são formados por dois anéis fenílicos ligados por uma ligação éter, os quais possibilitam realizar até 10 substituições com o elemento bromo, oferecendo assim 209 congêneres com características físico-químicas variadas, dependendo da ordem de substituição, cuja fórmula química é $C_{12}H_{(10-n)}Br_nO$, ($1 < n < 10$) (FROUIN, *et al.*, 2010)

Figura 1 - Estrutura básica dos éteres difenílicos polibromados (PBDEs) e das bifenilas policloradas (PCBs), respectivamente

A dispersão desses compostos no ambiente é agravada pelas ligações químicas fracas que eles realizam com a superfície dos polímeros, o que proporciona um aumento na sua volatilização (KRÓL, ZABIEGAŁA, NAMIESNIK, 2012). Além disso, a potencialidade dos PBDEs como poluentes emergentes se deve às suas propriedades de baixa solubilidade em água, alto coeficiente de partição octanol-água, persistência no meio ambiente e à capacidade de bioacumulação (SAPAZHNIKOVA, LEHOTAY, 2013).

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas das misturas de PBDE (ATSDR, 2015).

Propriedade	Penta-PBDE	Octa-PBDE	Deca-PBDE
Peso Molecular	Mistura	Mistura	959,22
Cor	Clara, amarelo pálido	Branco turvo	Branco turvo
Estado Físico	Líquido bastante viscoso	Pó	Pó
Ponto de Fusão	-7 a -3°C (comercial)	85 a 89°C (comercial) 200°C (faixa de 167-257) 79-87°C, 170-220° C	290-306° C
Ponto de Ebulição	>300° C (decomposição começa em 200° C)	Decompõe em >330° C (comercial)	Decompõe em > 320, >400 e > 425° C
Densidade (g/ml)	2,28 a 25°C; 2,25-2,28	2,76; 2,8 (comercial)	3,0; 3,25
Solubilidade: Água	13,3 µg/L (comercial) 2,4 µg/L (pentabromados) 10,9 µg/L (tetrabromados)	<1ppb a 25°C (comercial), 1,98 µg/L (heptabromados)	<0,1 µg/L
Solventes orgânicos	10g/kg de metanol/ miscível em tolueno	Acetona (20g/L) Benzeno (200g/L) Metanol (2g/L) todos a 25°C	Sem dados
Log K_{ow}	6,64 – 6,97; 6,57 (comercial)	6,29 (comercial)	6,265
Log K_{oc}	4,89 – 5,10	5,92 – 6,22	6,80
Pressão de Vapor	2,2.10 ⁻⁷ – 5,5.10 ⁻⁷ mmHg a 25°C; 3,5.10 ⁻⁷ mmHg (comercial)	9,0.10 ⁻¹⁰ – 1,7.10 ⁻⁹ mmHg a 25°C; 4,9.10 ⁻⁸ mmHg a 21°C (comercial)	3,2.10 ⁻⁸ mmHg

Desse modo, podem se bioacumular no solo, no ar, no esgoto, nos sedimentos e nos alimentos (BIRNBAUM, STASKAL, 2004; CETIN, ODABASI, 2007; ELJARRAT *et al.*, 2005; HOH, HITES, 2005; HYÖTYLÄINEN, HARTONEN, 2002; KLAMER *et al.*, 2005; VONDERHEIDE *et al.*, 2008; ZHU, HITES, 2005) e, portanto, os humanos podem se expor a esses compostos através da inalação de poeiras (JONES-OTAZO *et al.*,

2005; SJÖDIN *et al.*, 1999, 2001; WILFORD, *et al.*, 2005) e/ou ingestão de alimentos contaminados. A principal forma de exposição é pelo contato direto com a poeira formada pelos produtos fabricados com PBDEs, ou seja, na própria atmosfera residencial ou no ambiente de trabalho (JONES-OTAZO *et al.*, 2005). Estima-se, nos Estados Unidos, um nível de exposição de 80% a 90% por essa via, seguida por ingestão de comidas contaminadas (ATSDR, 2015). Sendo assim, de modo geral, calcula-se que a exposição humana aos PBDEs seja de 1000 a 10000 ng/dia. (JONES-OTAZO *et al.*, 2005).

Adicionalmente, sua organização estrutural permite a transformação desses compostos em dibenzo-p-dioxinas e dibenzofuranos (PBDD/Fs) e em misturas de polibromocloro-dibenzo-p-dioxinas e benzofuranos (PXDD/Fs) que são substâncias ainda mais tóxicas devido a sua similaridade com os homólogos clorados, cuja toxicidade é bem conhecida. Tal transformação pode ocorrer durante a produção, reciclagem ou incineração desses materiais (ZHANG, BUEKENS, LI, 2016), que são emitidos indiscriminadamente ao meio ambiente. As reações químicas provavelmente envolvidas neste processo estão representadas na **figura 2**.

Figura 2 - Reações químicas envolvidas na transformação dos PBDEs em PBDD/Fs e PXDD/Fs.

ZHANG *et al*, 2016. O caminho mais viável para a transformação dos PBDEs em PBDFs é pela perda de átomos de $-\text{Br}$ e $-\text{H}$ permitindo que o anel se feche, como indicado pela primeira reação. Já a formação de PBDDs envolve reações de oxidação dos anéis aromáticos.

1.3. Efeitos toxicológicos observados

Diversos estudos indicaram que o fígado, a glândula da tireóide e os órgãos reprodutores são alguns dos alvos de ação desses compostos apresentando, porém, efeitos mais proeminentes no sistema nervoso (DARNERUD *et al.*, 2001; KURIYAMA *et al.*, 2005). Dentre as disfunções observadas estão os déficits comportamentais, neuroquímicos, hormonais, disfunção global do desenvolvimento (autismo), alterações da imunologia, do aprendizado e da memória, hepatotoxicidade e mutagenicidade. (ERIKSSON, JAKOBSSON, FREDRIKSSON, 2001; HE *et al.*, 2009; VIBERG, FREDRIKSSON, ERIKSSON, 2005; ZHOU *et al.*, 2002; BRANCHI, ALLEVA, COSTA, 2002; BRANCHI *et al.*, 2003).

O desenvolvimento do “mal de Alzheimer”, devido a ação dos PBDEs nos receptores de acetilcolina (ERIKSSON *et al.*, 2002; VIBERG, FREDRIKSSON, ERIKSSON, 2005; LIANG *et al.*, 2010) é outro distúrbio possível. Por fim, também há evidências de induzirem morte celular (REISTAD, FONNUM, MARIUSSEN, 2006; MADIA *et al.*, 2004), como observado em células do tipo HepG2 (HU *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2013) nas quais ocorreu apoptose devido a produção de espécies reativas (ROS) e consequente desregulação da permeabilidade da membrana mitocondrial (PEREIRA *et al.*, 2013, 2014).

Um dos efeitos mais avaliados remete-se aos relacionados ao sistema endócrino, devido a semelhança das moléculas de PBDEs, especialmente os seus metabólitos, com as moléculas dos hormônios tireoidianos, estrogênio e progesterona, permitindo que sejam capazes de competir pelos sítios ativos das proteínas relacionadas a esse sistema (**Figura 3**). Dessa forma, são capazes de provocar o crescimento anormal dos órgãos femininos, bem como influenciar no crescimento dos tecidos dependentes da tireoide (COSTA, *et al.*, 2008; MCDONALD, 2002; TALNESS, 2008).

Figura 3 - Estrutura química dos metabólitos gerados a partir dos PBDEs em comparação ao hormônio tireoidiano T4, respectivamente.

A capacidade e a forma como os PBDEs são absorvidos, pelos seres vivos, varia de acordo com o número de bromos em sua estrutura, sendo o decaBDE a espécie menos assimilada e a mais efetivamente eliminada pelo corpo (HOOPER, MCDONALD, 2000). Em contrapartida, os congêneres menos bromados são mais persistentes, como por exemplo o BDE-99, encontrado em grandes concentrações no meio ambiente e no tecido humano (DARNERUD *et al.*, 2001; DE WIT, 2002; INOUE, HARADA, KOIZUMI, 2006; SCHECTER *et al.*, 2003; SCHECTE *et al.*, 2006). A alta lipofilicidade dos PBDEs permite que eles se acumulem nos tecidos por até trinta anos (LI *et al.*, 2005) e, em decorrência dessa característica, também podem se concentrar na gordura do leite ou na placenta, possibilitando que sejam transmitidos aos recém-nascidos. (STASKAL *et al.*, 2006, SHAO *et al.*, 2008).

Desse modo, diante dos efeitos toxicológicos dos PBDEs, de sua utilização em larga escala pela indústria e de sua consequente dispersão e bioacumulação no meio ambiente, tornou-se necessária a elaboração de uma legislação que limitasse o uso desses compostos. Visando este objetivo, as misturas penta e octa foram retiradas do mercado norte Americano e europeu em 2004, enquanto a deca deixou de ser importada pela Europa em 2008 e pelos Estados Unidos em 2013 (ATSDR, 2015; KRÓL, ZABIEGAŁA, NAMIESNIK, 2012). No entanto, nem todos os países se comprometeram da mesma forma, como por exemplo o Brasil, que apresenta apenas leis que limitam as suas concentrações (Projeto de Lei do Senado Nº 173, 2009).

Para sustentar essas regulamentações, muitos estudos foram desenvolvidos com o intuito de disponibilizar os dados toxicológicos necessários e muitos outros ainda estão sendo realizados para tentar elucidar seus mecanismos de ação.

1.4. Congênere BDE-209

O 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decaBDE (BDE-290) é o congênere mais produzido e utilizados pelas indústrias, principalmente para a produção de eletrônicos (HARDY, 2002). Por isso, ele é bastante encontrado em amostra coletadas em área com grande atividade industrial e/ou com descarte de lixos. No entanto, sua estrutura com os anéis aromáticos totalmente substituídos por bromo não favorece sua bioacumulação, pois sua lipofilicidade é bem menor que a dos demais congêneres. Da mesma forma, ele também é rapidamente eliminado dos organismos, o que diminui a potencialidade de seus efeitos tóxicos, em comparação aos congêneres menos bromados (ATSDR, 2016).

Não obstante, muito estudos demonstraram, que mesmo com essas características, este congênere é capaz de perturbar a homeostasia dos organismos e causar efeitos tóxicos preocupantes. Observou-se, por exemplo, que o congênere BDE-209 é capaz de se associar ao elemento cádmio (Cd), também muito presente no meio ambiente, e com isso causar um efeito aditivo na diminuição dos hormônios da tireóide, efeito este muito mais proeminente do que o constatado com eles isolados. (CURCIS et al, 2012/2014). Estudos citotóxicos também demonstraram que esse congênere provoca diminuição na viabilidade de células hepáticas (HepG2) e neurais (NSCs) (HU *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2010). Além disso, é considerado pelo EPA como um possível carcinógeno para humanos (ATSDR, 2014). Por fim, constatou que o BDE-209 pode sofrer fotodegradação e dar origem aos congêneres menos bromados (STAPLETON *et al.*, 2005), além de estarem susceptíveis a ação microbiana, que se mostrou capaz de gerar subprodutos tóxicos (LEE, HE, 2010).

Figura 4 - Estrutura do congênere 209, avaliado nesse projeto.

1.5. Método de quantificação em sedimentos e local de amostragem

Devido aos seus efeitos tóxicos e a possibilidade de acúmulo no ambiente, se faz necessária a avaliação destes compostos em amostras ambientais. No entanto, o grande número de congêneres requer a utilização de métodos capazes de separá-los e quantificá-los adequadamente, sendo a cromatografia gasosa (CG) muito eficiente para essa finalidade. Porém, o problema das análises de meio ambiente é que as amostras contêm um grande número de outros compostos na matriz, que podem coeluir com o analito, gerando resultados quantitativos errôneos. As amostras de sedimentos podem conter compostos inorgânicos como o enxofre ou orgânicos como os hidrocarbonetos, que interferem na análise dos BFRs pela CG (HYÖTYLÄINEN, HARTONEN, 2002). Portanto, devem ser eliminados com cobre metálico e uma coluna de sílica-gel, respectivamente (HYÖTYLÄINEN, HARTONEN, 2002; KRÓL, ZABIEGAŁA, NAMIENIK, 2012). Para melhorar a sensibilidade e seletividade, pode-se utilizar a cromatografia gasosa acoplada a um detector de captura de elétrons (NAMIENIK e ZYGMUNT, 2002) ou a um espectrômetro de massas.

Neste trabalho, o local de amostragem para esse tipo de análise foi escolhido por representar um ponto de recarga do Aquífero Guarani. Este reservatório de água subterrâneo abastece todas as necessidades de água da cidade de Ribeirão Preto (DAERP) e, por isso, é de vital importância sua preservação, bem como a manutenção da qualidade dessa fonte. A cidade de Ribeirão Preto está localizada na porção nordeste do Estado de São Paulo (latitude 21 ° e 21 ° 30 'S e longitude 47 ° 30' e 48 ° W), sendo tipicamente urbana, com suas atividades focadas no comércio, serviços e no cultivo de cana. Seu clima

é tropical úmido, apresentando verões úmidos e invernos secos, período este em que a coleta de amostras foi realizada.

Figura 5 – Representação geográfica e espacial dos pontos de amostragem de sedimentos para as análises de quantificação de PBDEs em sedimentos.

SILVA *et al.*, 2008 e Google Maps. O círculo vermelho indica a localização da Lagoa do Saibro, no Parque dos Lagos em Ribeirão Preto (esquerda). A figura da direita esquematiza os pontos de amostragem 1, 2 e 3.

1.6. Morte Celular

Uma célula normal é capaz de realizar a homeostasia de seu estado fisiológico, no qual mantém o equilíbrio de todas as suas atividades. Mesmo na presença de estímulos externos ou em situações adversas e estressantes, essa célula ainda é capaz de se adaptar para, assim, continuar com suas funções e sobrevivência. Sendo assim, ao final desse evento, quando o estímulo se cessa, ela volta ao estado normal sem maiores consequências. Porém, há um limite para essa capacidade de adaptação e, quando

ultrapassado, começa a originar lesões, que ainda podem ser reversíveis, mas dependendo da intensidade e frequência de exposição, se tornam irreversíveis, ocasionando morte celular. (ROBBINS; COTRAN, 2010). Existem três vias principais de morte celular, a necrótica, a apoptótica e a autofágica. Na verdade, há divergências sobre a classificação dos tipos de morte celular, conquanto alguns autores enquadram senescência, mitose catastrófica e necrose tardia como tipos de morte celular, enquanto outros autores como subtipos das anteriormente citadas.

Todavia, a morte celular não é apenas uma consequência negativa ou passiva proveniente de uma disfunção da homeostasia, mas é também uma resposta necessária para o adequado desenvolvimento e manutenção de um tecido ou sistema. (INDRAN *et al.*, 2011). Isso é o que ocorre, por exemplo, no processo apoptótico, responsável pela destruição programada das células durante a embriogênese ou quando estas estão envelhecidas ou não funcionais.

1.6.1. Necrose

A necrose distingue-se como uma morte celular mais drástica, normalmente associada a patologias, na qual ocorre a ruptura da membrana e o extravasamento do conteúdo celular, processo esse que pode gerar inflamações. Morfologicamente, observa-se inchaço citoplasmático e da mitocôndria, agregação da cromatina, ruptura das organelas, formação de vesículas e, por fim, lise celular (TRUMP *et al.*, 1997).

De modo geral, a necrose não apresenta uma cascata bioquímica de sinalização restrita ou gasto de energia para sua ativação, ou seja, não é uma morte programada pela célula. Por estar associada a traumas e estresses físico-químicos ou a infecções (KRYSKO *et al.*, 2008), os lisossomos das próprias células digerem as organelas após o rompimento da membrana ou então elas são fagocitadas pelo sistema imunológico.

No entanto, estudos recentes mostraram que a necrose pode ser ativada por enzimas específicas de modo similar ao que ocorre na apoptose e por isso denominaram-na de necroptose. Neste processo, enzimas da família TNF, reguladas por kinases do tipo RIPK1 e RIPK3, são ativadas e formam complexos com domínios de mortes, nos quais as caspases iniciadoras são ligadas e ativadas, iniciando assim, o processo de morte descrito na apoptose (EDINGER, THOMPSON, 2004; BERGHE *et al.*, 2014).

1.6.2. Apoptose

A apoptose caracteriza-se especialmente por manter a integridade das organelas, pela condensação da cromatina e pela fragmentação do DNA e da membrana plasmática, formando corpos apoptóticos. As alterações celulares que ocorrem nessa via atraem os fagócitos, que as digerem, tudo isso de forma programada e com gasto de ATP e é, por isso, considerada um “suicídio celular”. Como não ocorre o rompimento da membrana, e o consequente extravasamento celular, a apoptose não acarreta uma resposta inflamatória, evitando lesão tecidual paralela (EDINGER, THOMPSON, 2004; INDRAN *et al.* 2011; ROBBINS; COTRAN, 2010).

Bioquimicamente, esse processo de morte celular associa-se especificamente à ativação de enzimas do tipo cisteína proteases, chamadas caspases, que se tornam ativas por clivagem (FAVAROLO *et al.*, 2012; TADOKORO *et al.*, 2010). Ao final do processo, a membrana sofre modificações para que seja reconhecida pelos fagócitos, das quais a principal mudança é a exposição de fosfolipídios (fosfatidilserina) ao meio externo à célula.

Como citado, a apoptose é um processo extremamente regulado e esse controle se dá por uma cascata de sinalização envolvendo várias proteínas e enzimas, bem como o incentivo à transcrição de determinados genes. Em humanos, tem-se uma família de proteínas supressoras de apoptose denominadas *Bcl-2* que estão sempre associadas à proteína APAF-1 (fator de ativação de protease associada à apoptose 1). Essa associação impede a ativação de proteínas pró-apoptóticas, mas quando a apoptose se faz necessária, uma proteína denominada *Bax* se liga à *Bcl-2*, liberando a APAF-1 que se associa ao citocromo c presente e ativa a caspase 9, uma proteína pró-apoptótica. (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; YUAN, AKEY, 2013)

1.6.2.1. Processo Apoptótico

A apoptose ocorre em duas fases, uma iniciadora do processo, na qual os estímulos desencadeiam a cascata de sinalização e uma executora, relacionada a degradação dos componentes celulares. Esta inicialização pode ocorrer por duas vias distintas, que apesar de independentes, podem acontecer simultaneamente (FAVAROLO *et al.*, 2012):

- Via extrínseca

Esta via é ativada por sinais extracelulares que são captados por receptores presentes nas membranas plasmáticas. Tais receptores pertencem à família dos receptores de fatores de necrose tumoral, TNF (Fas/CD95, TNFR1 e TRAILR1/2), que apresentam sítios de ligação para ligantes como FasL/CD95L, TNF α e TRAIL. Na face citosólica, estes apresentam uma sequência de aminoácidos rica em cisteína, denominada de domínio de morte, na qual se ligam proteínas desencadeadoras do processo apoptótico, tais como as RIPK1, FADD, c.FLIP, cIAPs (GALLUZZI *et al.*, 2012).

Para o caso do receptor do tipo FAS, suas subunidades formam trómeros ao longo da membrana plasmática, cuja estrutura é estabilizada ao interagir com seu ligante, formando assim, um complexo de domínios de morte. A esse complexo se liga a chamada proteína associada a Fas com domínio de morte (FADD). Esta proteína apresenta um outro domínio conhecido por domínio de morte efetor (DED), que se liga a um domínio homólogo na pró-caspase-8 (ou -10 em humanos). Esta ligação causa mudanças conformacionais, que permitem a clivagem desta caspase, ativando-a. Na sequência, ela ativa as caspases executoras (caspase-3), que realizam o processo de morte por apoptose. (FAVAROLO *et al.*, 2012; GALLUZZI *et al.*, 2012)

- Via intrínseca

A via intrínseca de apoptose tem como fator chave, os processos envolvendo a mitocôndria e, dessa forma, é o principal mecanismo apoptótico das células mamíferas. A eficiência desse processo depende, de modo geral, de um estrito equilíbrio entre as proteínas pró e anti-apoptóticas da família Bcl-2 que controlam a permeabilidade mitocondrial. Dentre as proteínas pró-apoptóticas estão as Bik, Blk, BNIP-3, Bim-L, Bad, Bid, PUMA e NOXA que compõem o grupo das BH3-only, ou seja, que possuem apenas um domínio BH3. Existe também um segundo grupo que, no entanto, apresentam multidomínios, composto pelas proteínas Bax e Bak. As anti-apoptóticas, por sua vez, são as proteínas Bcl-xL, Bcl-W, MCL-1 e BFL-1. (HAPPO, STRASSER, CORY, 2012).

Na presença de danos ao DNA, acúmulo de Ca²⁺ no citosol, ou outras situações estressantes à célula, sinais são gerados e convergidos à mitocôndria. Tais sinais estimulam um aumento na síntese das proteínas pró-apoptóticas, que se ligam às anti-apoptóticas, presentes na membrana externa da mitocôndria, liberando a APAF-1 e

impedindo que elas promovam a sobrevivência da célula. (CHEN *et al.*, 2005). Na sequência, as proteínas do tipo Bax/Bak interagem com a membrana, gerando um colapso no potencial de membrana mitocondrial e criando alguns poros, que permitem a migração de terminadas moléculas responsáveis pelo início do processo apoptótico, tais como o citocromo c. Este se associa à APAF-1, formando um complexo denominado apoptossomo, que é responsável pela ativação da caspase 9, culminando, por fim, no processo apoptótico.

No entanto, agentes capazes de alterar o potencial da membrana mitocondrial, como por exemplo o acúmulo de espécies oxidativas (EROs), permitem que ocorra o extravasamento do citocromo c, acarretando todo o processo anteriormente descrito.

Figura 6 - Via intrínseca e extrínseca da apoptose.

ROBBINS, CONTRAN, 2010. Figura à esquerda ilustra a via intrínseca, na qual um estresse à célula inicia a ativação de proteínas do tipo BH3, como a Bax e Bak, que se ligam às Bcl-2 presentes na membrana mitocondrial, promovendo sua permeabilidade e o extravasamento do citocromo c. À direita tem-se a via extrínseca esquematizado pelo complexo do tipo Fas, mostrando seu domínio de morte e a ligação e ativação da caspase-8.

1.6.3. Autofagia

A autofagia é um processo catabólico regulado pelas condições do meio e está relacionado com a degradação e reciclagem dos componentes celulares. Em outras palavras, é um importante meio de manutenção do balanço entre o anabolismo e catabolismo, promovendo o crescimento e desenvolvimento das células (REGGIORI, KLIONSKY, 2002). Porém, também está envolvida na diferenciação, no envelhecimento, na morte celular e na prevenção de alguns cânceres (KLIONSKY, EMR, 2000). A autofagia é induzida por sinais pró-autofágicos, que são comuns durante a inanição e privação de oxigênio, bem como na presença ou acúmulo de organelas danificadas, toxinas, compostos citotóxicos e determinados hormônios.

A estrutura celular responsável por essas ações em células eucariotas é o lisossomo, que apresenta em seu interior, hidrolases capazes de digerir os componentes que até lá são transportados. O lisossomo pode realizar esse processo de duas formas, a primeira, chamada de macroautofagia, consiste na formação de uma vesícula de membrana dupla que engloba o componente alvo no citosol e, na sequência, essa se funde com a membrana do lisossomo, liberando o componente em seu interior. Há uma macroautofagia específica para proteínas com estrutura terciária mal enovelada, chamada de autofagia mediada por chaperonas. Nesta, as chaperonas que auxiliam no dobramento das proteínas, encontram-se ainda ligadas aos sítios das proteínas devido ao mal enovelamento e são, então, reconhecidas pelos lisossomos que iniciam a degradação dessas estruturas para a reutilização dos aminoácidos.

A mitofagia, por sua vez, é uma autofagia específica, destinada a reciclagem de mitocôndrias, que desempenha um grande papel na sobrevivência da célula, sendo ela, o principal mecanismo para a remoção de mitocôndrias defeituosas (MICHEL, WANET, *et al.*, 2012; TOLKOVSKY, 2009). A segunda forma de autofagia, a microautofagia, resume-se em realizar o sequestro do componente alvo por invaginação da própria membrana do lisossomo e, ao final do procedimento, a vesícula formada se rompe do resto da membrana e migra para o interior da organela (MASSEY, ZHANG, CUERVO, 2006; MIZUSHIMA *et al.*, 2008).

Como todo processo bioquímico, a autofagia é regulada e auxiliada por uma gama de proteínas e enzimas, tendo a família Atg como destaque. Esta família está envolvida em variadas etapas da autofagia, tendo intensa atividade no início do processo, no qual

há a formação do fagóforo, responsável pela nucleação, e na do autofagossomo, que é uma vesícula de dupla camada de membrana. Especificamente, participam da formação do fagóforo, juntamente com a fosfatidilinositol 3-cinase classe III (PI3KIII), as Atg5, 6, 7, 10, 12 e 16. Já na formação do autofagossomo, ocorre uma conjugação, mediada pelas Atg7 e Atg10, na qual a Atg12 é ligada covalentemente à Atg5 e, depois, à membrana do autofagossomo (**Figura 7**). Nesta etapa, há a importante participação da Atg8, também conhecida como LC3, que sofre lipidação pela Atg7, se acoplando à membrana (BEHRENDTS *et al.*, 2010).

A LC3 é importante devido ao seu papel como principal marcador do desenvolvimento da autofagia, uma vez que essa proteína sofre uma modificação pós-traducional durante esse processo celular. Essa alteração consiste em clivagem da molécula, originando sua forma citosólica denominada LC3-I. Quando a autofagia é iniciada, essa nova molécula sofre uma outra clivagem e uma lipidação com a fosfatidiletanolamina, por uma via que envolve as proteínas Atg7 e Atg3, que convertem o LC3-I em LC3-II (WU, DANG, *et al.*, 2006). Por fim, o processo culmina na fusão do autofagossomo ao lisossomo, formando o autofagolisossomo, responsável pela degradação das estruturas englobadas.

Uma outra proteína importante na regulação do processo autofágico é a mTOR (mammalian target of rapamycin), uma serino-treonina cinase que tem como funções principais a ativação da proteína Akt e a sinalização dos níveis de ATP e aminoácidos durante a coordenação do crescimento celular (DENNIS, JAESCHKE, *et al.*, 2001). Nesta molécula, quando os ligantes se acoplam aos seus receptores, ocorre a ativação da proteína PIK3, ocorrendo a formação de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃), que atua como sinalizador intracelular nos processos de crescimento, ciclo, migração e metabolismo celular (ENGELMAN, LUO, CANTLEY, 2006).

Além disso, a mTOR, em condições normais da célula, é responsável por inibir a ativação da autofagia através da fosforilação da Atg 13, diminuindo sua afinidade pela Atg1. Há também indícios de que as proteínas anti e próapoptóticas apresentam papéis expressivos na regulação da autofagia (LIN, BAEHRECKE, 2015). Dessa forma, observou-se que a autofagia pode estimular a sobrevivência da célula ou induzi-la a morte e que, portanto, a ativação ou inibição de proteínas autofágicas, como a mTOR, podem influenciar na cascata apoptótica, mostrando uma importante ligação entre os dois tipos de morte celular (**Figura 8**). (CALASTRETTI *et al.*, 2001; RAVIKUMAR *et al.*, 2006).

A rapamicina, por exemplo, é uma lactona macrocíclica isolada do fungo *Streptomyces hygroscopicus* capaz de inibir a atividade da mTOR e aprovada pelo FDA como antibiótico e imunossupressor. Estudos clínicos mostraram a eficácia dessa substância na terapia contra o câncer e na prevenção de certos problemas cardíacos e neurológicos (CARLONI *et al.*, 2008; ERLICH *et al.*, 2007; RAVIKUMAR *et al.*, 2006). Devido a isso, esse projeto focou-se em avaliar que tipo de influência a indução autofágica por rapamicina causaria na capacidade toxica do BDE-209 sobre as células HepG2.

Figura 7 - Cascata sinalizadora de autofagia.

LIN, BAEHRECKE, 2015. Interação de certas proteínas da família Atg com o Complexo PI3K na formação do fagôforo. Na sequência, ocorre a participação de outras Atg no desenvolvimento da membrana até formarem o autofagossomo, que por sua vez, se incorpora ao lisossomo.

Figura 8 – “Crosstalk” entre apoptose e autofagia

NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013. Proteínas e organelas envolvidas nos processos apoptótico e autofágico, bem como aquelas compartilhadas por ambos. Destaque a p53 que apresenta grande influência tanto na apoptose quanto na autofagia. Setas indicam estimulação da via e as barras, inibição.

2. OBJETIVOS

Esse projeto foi desenvolvido com o objetivo de investigar a influência da indução do processo autofágico na toxicidade do congênere BDE-209, por comparação entre modelos com e sem a presença de rapamicina, um indutor autofágico. Além disso, avaliar os níveis de contaminação por PBDEs em amostras de sedimentos coletadas no Parque dos Lagos em Ribeirão Preto-SP.

Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar as alterações causadas na toxicidade do BDE-209 através da indução da autofagia nos processos de:
 - Proliferação e viabilidade celular;
 - Ciclo celular;
 - Fragmentação celular;
 - Exposição da fosfatidilserina

- ✓ Caracterizar o tipo de morte celular predominante após o processo autofágico e se este exerce um efeito de proteção à célula, ativando os sinais de sobrevivência destas, ou um efeito antagônico a esse;

- ✓ Quantificar a presença de PBDEs em amostras de sedimentos da região de Ribeirão Preto - SP por cromatografia gasosa acoplado a um detector por captura de elétron (CG-ECD).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

3.1.1. Quantificação nos sedimentos

Todos os solventes e reagentes utilizados na quantificação das amostras de sedimentos apresentavam pureza de grau analítico ou superior, sendo de grau pesticida a acetona, diclorometano, hexano, pentano, iso-octano, adquiridos de Tedia (Fairfield, EUA). Ácido clorídrico PA ACS (36,5-38% v/v), ácido sulfúrico PA (95- 99% v/v), sulfato de sódio anidro e a sílica gel 60 (0,05 a 0,2 mm) foram adquiridos pela Vetec (Rio de Janeiro, BRA). O padrão utilizado para a construção da curva analítica foi o *Lake Michigan Study - LMS* – da AccuStandard na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em isooctano. Os congêneres presente nesse padrão eram os BDE-28, -47, -66, -100, -99, -85, -154, -153 e -138, usado em concentrações de 0,05; 0,1; 1,0; 5,0; 10,0 e 20,0 ng mL⁻¹ em isooctano.

3.1.2. Análises toxicológicas

O congênere BDE-209 foi obtido da AccuStard (EUA). Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO), iodeto de propídeo (PI), mix de antibiótico-antimicótico, piruvato de sódio, ribonuclease A (RNase), sulforodamina B (SRB), terc-butil hidroperóxido (TBOOH), 2'-(4-Etoxifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-tri-hidroclorato de 2,5'-bi-1H-benzimidazol (Hoechst 33342), tripsina 10X, Triton X-100 foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). O meio de cultura celular MEM (Gibco®) foi obtido da Life-Technologies (Carlsbad, EUA). Meio de cultura DMEM sem vermelho de fenol foi obtido da LGC Biotecnologia (Cotia, Brasil). Soro bovino fetal (SBF; Gibco®) foi obtido da Life-Technologies (Brasil). A Anexina V-FITC foi comprada da BD Biosciences (San Diego, EUA). Cisplatina 1mg/mL (*Fauldcispla®*, LIBBS - São Paulo, Brasil) foi obtida da Cirúrgica Mafra-Medicamentos e Materiais Hospitalares (Ribeirão Preto, Brasil).

3.2. Quantificação das amostras de sedimentos

3.2.1. Limpeza de vidrarias para determinação analítica de orgânicos em níveis traço

3.2.1.1. Método por Ultrassom

Método utilizado para limpeza de vidrarias volumétricas, no qual a vidraria é lavada com etanol comercial e água destilada. Depois, realiza-se um banho de ultrassom por 15 minutos com os seguintes solventes: (1) acetona; (2) hexano e (3) isocatano (solventes grau pesticida). Após a lavagem, seca-se em fluxo de nitrogênio (ou naturalmente sobre papel absorvente em uma estufa) e, por fim, selam-se os orifícios de cada vidraria com folhas de alumínio.

3.2.1.2. Método por Calcinação

Método utilizado para limpeza de vidrarias não volumétricas, no qual também se lava a vidraria com etanol comercial e água destilada. Se necessário, usam-se esponja e detergente neutro para remover possíveis sujeiras presentes no vidro. Secar à temperatura ambiente e logo após, tampar com papel alumínio. Calcinar em mufla por 4 horas a uma temperatura de 350°C. Armazenar as vidrarias em caixa plástica com tampa e previamente limpa.

3.2.1.3. Método por Solvente

Utilizado para limpeza de vidrarias volumétricas, na qual deve-se lavar a vidraria com bastante etanol comercial e água destilada. Na sequência, lava-se com os seguintes solventes: (1) acetona; (2) hexano e (3) isoctano (solventes grau pesticida). Após a lavagem secar em fluxo de nitrogênio (ou secar ao ar sobre papel absorvente em ambiente apropriado) e selar os orifícios de cada vidraria com papel alumínio.

3.2.2. Amostragem e preparação das amostras

Para a amostragem pode-se utilizar diferentes pás de aço inoxidável, como as dragas tipo Van Veen (DE LA CAL, ELJARRAT e BARCELÓ, 2003; ZHAO, ZHANG, *et al.*, 2011). As amostras de sedimento superficial da lagoa do Parque dos Lagos em Ribeirão Preto, SP foram coletadas manualmente, pelos técnicos da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB. As amostras obtidas foram acondicionadas em frascos de vidro limpo, conforme procedimento de limpeza explicado anteriormente. Após levadas ao laboratório, foram armazenadas em refrigerador numa temperatura inferior a 4°C e, depois, secas por liofilização, que permite uma rápida remoção de água sem grandes alterações na constituição do sedimento. Na ausência do liofilizador, as amostras podem ser secas em capela, sob fluxo de ar e com a porta semi-fechada, dispostas em placas de petri tampada com papel alumínio para evitar contaminação, como foi o caso deste projeto. Nesse papel, devem ser feitos pequenos furos com a ponta de uma pipeta de Pasteur para permitir a evaporação da água.

3.2.3. Metodologia de Extração

Nesse estudo, aplicou-se extração por ultrassom, que consiste na aplicação de uma radiação ultrassônica que aumenta a transferência do analito em questão para a fase líquida, melhorando assim, a eficiência da extração (KRÓL, ZABIEGAŁA e NAMIESNIK, 2012). Para isso, o procedimento se realizou em um banho de ultrassom (Equipamento Cole-Parmer, 8893) dentro de tubos de ensaio com tampa, empregando 3,0 gramas de sedimento e 10,0 mL de uma mistura de solventes pentano/acetona (1:1). Aplicou-se essa extração por cinco vezes ao mesmo extrato e, ao final, todas as soluções obtidas foram misturadas e centrifugadas a 2500 rpm por 5 min.

Em seguida, a etapa de *clean-up* foi realizada em coluna *Tri-Ad* (sílica ácida, sílica básica, sílica neutra e sulfato de sódio anidro como agente dessecante), usando 50 mL de pentano como eluente e o extrato foi novamente concentrado a um volume final de 1,0mL em isoctano. Por fim, o enxofre foi eliminado do extrato através de tratamento com cobre metálico por 24 h no escuro (balão deve ser coberto com papel alumínio) e sob refrigeração.

3.2.4. Método Instrumental

Os experimentos de determinação analítica dos PBDEs em amostras de sedimento foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Fernando Fabriz Sodré, chefe do grupo de automação, quimiometria e química ambiental da Universidade de Brasília (UnB). Tal separação e quantificação foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a um detector por captura de elétron, aparelho do tipo CG-ECD 2010 Plus System da Shimadzu localizado na Central Analítica do Instituto de Química – Universidade de Brasília (CAIQ-UnB).

A coluna utilizada a Supelco SLM TM-5ms (30m x 0,25mm x 0,25µm) para os todos os congêneres com exceção ao BDE-209 que não foi analisado neste projeto. O volume de injeção aplicado de cada amostra foi de 2µL através do modo de injeção pulse/splitless, cuja temperatura do injetor encontrava-se à 250°C. O gás Hélio foi o gás carreador e a programação das temperaturas aplicada na coluna está esquematizada na **tabela 3**.

Tabela 3 - Programa de temperatura do forno

	Taxa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
0		100	2,0
1	15.0	160	0.0
2	4.0	280	10.0
3	10.0	300	10.0
Tempo total: 58 min			

3.2.4.1. Validação do método

Os valores obtidos no processo de validação desenvolvido e realizado pelo grupo de automação, quimiometria e química ambiental da Universidade de Brasília (UnB) estão expressos nas **tabelas de 4 a 7** e na **figura 8**

Tabela 4 - Linearidade.

Analito	Curva Analítica	
	Faixa Linear ^a	R
BDE-28	0,05 a 20,0	0,9979
BDE-47	0,05 a 20,0	0,9985
BDE-66	0,05 a 20,0	0,9982
BDE-100	0,05 a 20,0	0,9981
BDE-99	0,05 a 20,0	0,9975
BDE-85	0,1 a 20,0	0,9983
BDE-154	0,1 a 20,0	0,9983
BDE-153	0,1 a 20,0	0,9974
BDE-138	0,1 a 20,0	0,9967

^a Faixa linear em ng.mL⁻¹
Tabela 5 - Limites de detecção e quantificação (ng.g⁻¹)

Analito	Curva Analítica	
	LOD ^a	LOQ ^a
BDE-28	0,03	1,92
BDE-47	0,21	2,05
BDE-66	0,23	2,31
BDE-100	0,23	2,31
BDE-99	0,26	2,67
BDE-85	0,23	2,35
BDE-154	0,23	2,31
BDE-153	0,29	2,86
BDE-138	0,32	3,21

^a Foram empregados 3 gramas de sedimento

Figura 8 - Cromatograma do extrato fortificado com PBDE.

- 1- Extrato de sedimento fortificado com nove congêneres de PBDEs em concentração de $5,0\text{ng.ml}^{-1}$.
- 2- Extrato de sedimento sem PBDEs.

Tabela 6 - Valores de recuperação das amostras fortificadas.

Analito	Recuperação (%)	CV (%)
BDE-28	98	3
BDE-47	98	4
BDE-66	98	5
BDE-100	98	7
BDE-99	98	6
BDE-85	93	6
BDE-154	92	7
BDE-153	91	5
BDE-138	90	3

Tabela 7 - Recuperação entre dias

Analitos	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	Recup. (%)	CV	Recup. (%)	CV	Recup. (%)	CV
BDE-47	99	2	97	3	100	1
BDE-100	97	6	95	6	98	6
BDE-99	99	2	97	4	99	3
BDE-154	93	4	91	6	94	4
BDE-153	91	6	89	7	91	6

3.3. Estudos toxicológicos em células HepG2

3.3.1. Cultivo de células

Os compostos foram analisados por pré-incubação dos mesmos em culturas de células do tipo HepG2 (American Type Culture Collection, N° HB 8065). Estas foram cultivadas em meio “Minimum Essential Medium” (MEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina G 100 UI/mL, estreptomicina 100 µg/mL e piruvato sódico 1mmol/L, tendo o pH de 7,4 da solução ajustado com bicarbonato de sódio. Os procedimentos experimentais foram realizados em frascos de cultura, a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂.

Para a adequada utilização das células, estas foram submetidas ao teste de exclusão com azul de Tripán. Este método baseia-se na incorporação do corante pelas células inviáveis, cuja membrana não se encontra mais íntegra, permitindo assim a quantificação das células viáveis através de uma câmara de Neubauer. As culturas de células consideradas adequadas apresentavam ao menos 90% de células viáveis.

3.3.2. Incubação com o congênere

Células HepG2 foram expostas às soluções padrões do congênere BDE-209, utilizando concentrações de 1, 5, 10 e 25 µmol/L. Estes padrões, por sua vez, foram dissolvidos em dimetil-sufóxido (DMSO) e ministrados de forma que a solução final, em todos os poços de cultura, apresentasse 1,0% do solvente.

Para os ensaios desenvolvidos, as células foram plaqueadas em plaquinhas específicas por um período de 24 horas para adequada aderência das mesmas. Na sequência, estas foram tratadas com a solução de PBDE e rapamicina por períodos de 24 e 48 horas. Foram realizados grupos controles, bem como concentrações de PBDEs com e sem rapamicina para posterior comparação, sendo todos analisados em triplicata. O mesmo ocorreu para os ensaios, que também foram realizados em triplicatas.

3.3.3. Proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada utilizando-se o corante sulforodamina B, de acordo com SKEHAN (1990), cujo método baseia-se na capacidade desse corante, negativamente carregado, se ligar estequiometricamente aos aminoácidos básicos presentes nas proteínas celulares. Desse modo, é possível monitorar a taxa de crescimento celular e para isso foram incubadas aproximadamente 5×10^4 células em placas de 24 poços por períodos de 24 e 48 horas. Após a incubação, o meio de cultivo foi retirado e as células lavadas com solução salina tamponada (PBS) e água. As células aderidas foram então fixadas com metanol contendo 1% de ácido acético 1%, por duas horas.

Por fim, estas foram coradas com sulforodamina B 0,5% em ácido acético 1% (m/v). Transcorrido o tempo de uma hora, o excesso de corante foi removido por lavagem com solução de ácido acético 1% em água. Para a quantificação do corante aderido na membrana celular, este foi solubilizado com solução tampão Tris 10 mmol.L⁻¹ em pH 10. Para tal, o equipamento utilizado foi SpectraMax M5 Microplate Reader a um comprimento de luz de 540 nm (SoftMax Pro Software).

3.3.4. Viabilidade Celular

A viabilidade das células foi determinada por meio do ensaio de viabilidade/citotoxicidade utilizando brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5 difenil tetrazólio (MTT), baseado nos procedimento de Denizot e Lang, 1986. O princípio do método reside na redução do corante pela enzima succinato desidrogenase presente nas mitocôndrias, formando um produto colorido e insolúvel em água, chamado sal de formazan. Este processo, porém, só ocorre em células viáveis e com o metabolismo ativo o que, portanto, permite a quantificação da viabilidade do sistema após exposição ao xenobiotico.

Para isso foram incubadas aproximadamente 2×10^3 células em placas de 96 poços por 24 e 48 horas. Após o tempo de exposição aos PBDEs, o meio de cultivo foi retirado e as células incubadas com solução de MTT 0,5% em meio sem vermelho de fenol (DMEM). A placa foi então protegida da luz e armazenada na estufa à 37°C, com atmosfera contendo 5% de CO₂ por um período de 3 horas. Após esse procedimento, a solução foi descartada e o sal formado foi solubilizado com solução de DMSO com tampão glicina 0,2 mol.L⁻¹ em pH 10,2. A leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro SpectraMax M5 Microplate Reader a um comprimento de luz de 570 nm (SoftMax Pro Software).

3.3.5. Condensação e Fragmentação nuclear

As células, neste ensaio, foram avaliadas de acordo com determinadas mudanças morfológicas nucleares, como cromatina com visíveis sinais de marginalização e núcleos fragmentados, que são sinais característicos de morte por apoptose. Para tal, utilizou-se o método de microscopia de fluorescência para observar as células coradas que apresentavam núcleos irregulares.

Foram cultivadas e tratadas sobre lamínulas 5×10^4 células que após o tratamento foram fixadas utilizando metanol por 2 horas, à -20 °C. Por fim, foram coradas com Hoechst 33342 (5 mg/mL) e as lamínulas retiradas e fixadas em lâminas para microscópio. Trezentas células em diversos campos aleatoriamente escolhidos foram

contadas para a determinação da porcentagem do número de células que apresentavam fragmentação ou condensação nuclear.

3.3.6. Exposição de fosfatidil serina na face externa da membrana celular (Anexina V/FITC - PI)

Este experimento tem por objetivo avaliar a proeminência dos tipos de mortes celular (apoptose e necrose) após a exposição ao xenobiótico. No caso do processo apoptótico, uma das primeiras transformações que a célula sofre é a transferência da fosfatidil serina à face externa da membrana celular. A utilização de uma solução de Anexina V, uma proteína com alta afinidade ao fosfolípídeo citado, permite que eles sejam quantificados, quando exposto na membrana, através de marcação fluorescente (ZHIVOTOVSKY, SAMALI, *et al.*, 1999). O iodeto de propídio (PI), por sua vez, sinaliza a ocorrência de necrose ou apoptose tardia, já que nesses casos ocorre a formação de poros ou rompimento da membrana celular, permitindo a incorporação do PI e a sua ligação ao DNA (SIBOV *et al.*, 2012).

Desse modo, o método consistiu no plaqueamento de 1.10^5 células em placas de 6 poços, que após a tripsinização, foram lavadas com PBS gelado e centrifugadas a 750g por 6 minutos. Na sequência, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspense em solução tampão de ligação (Hepes 10 mmol/L; NaCl 140 mmol/L; CaCl_2 2,5 mmol/L; pH ~7,4) contendo 0,25 µg/mL de Anexina e 0,5 µg/mL de iodeto de propídeo (PI). Essa solução deve ser protegida da luz e armazenada em gelo e, então, analisada em um citômetro de fluxo, que nesse caso foi o modelo FACSCanto (BD; EUA), no qual foram quantificados 10000 eventos por poço.

3.3.7. Ciclo Celular

O ciclo celular representa determinadas etapas nas quais a célula sofre modificações específicas com o intuito de se replicar. Em eucariotos esse ciclo poder ser dividido primeiramente em interfase, na qual a célula apresenta intensa atividade metabólica e acúmulo dos nutrientes necessários para sua divisão, além de realizar aumento de volume e duplicação da cromatina. O segundo período é o da mitose

propriamente dita (fase M), na qual ocorre a segregação do material genético e a formação de duas células-filhas idênticas.

Para o ensaio de ciclo celular, o período alvo é a interfase, que por sua vez pode ser dividida em G1 (gap 1), S (síntese de DNA) e G2 (gap 2). Na primeira fase a célula aumenta de tamanho e sintetiza tudo que é necessário para a síntese de DNA, enquanto na fase G2, além da síntese proteica, ocorre a duplicação das organelas. A transição entre cada fase é mediada por proteínas de checagem que avaliam se a célula se encontra na situação necessária para progredir. Caso contrário, a célula é impedida de continuar o ciclo para que assim seus defeitos não sejam repassados para as células-filhas. Dessa forma, a avaliação quantitativa de cada fase permite determinar se ocorreu algum dano celular que impediu a célula de realizar seu ciclo adequadamente.

Para esse ensaio foram plaqueadas aproximadamente 1×10^5 células por poço em uma placa de 6 poços. Após o tratamento, decorrido o tempo de exposição, o meio de cultivo foi descartado, as células lavadas com PBS, tripsinizadas e novamente lavadas com PBS. O precipitado contendo as células foi então suspenso em solução de etanol 70% contendo 5% de PBS e armazenado por 24 horas a -20°C .

Em seguida, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o pellet suspenso em solução de PBS contendo RNase e incubado por 30 minutos na estufa à 37°C , em atmosfera contendo 5% de CO_2 . Ao término desta etapa, as amostras foram colocadas em gelo e então adicionou-se uma solução de HFS (*high fluorescence solution*) contendo 0,1 % de citrato de sódio (massa/volume), 0,1% de triton (volume/volume) e PI 5 $\mu\text{g/mL}$. As células foram incubadas por 1 hora protegidas da luz e logo após foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto (BD; EUA). Foram avaliados 10.000 eventos por poço. Os resultados obtidos por citometria de fluxo foram analisados por meio do software ModFit LT 3.3 (Verity Software House, EUA) para Windows.

3.3.8. Análise estatística

Para avaliar se houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e seu respectivo controle, foram feitas a análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnet. As análises foram feitas por meio do programa GraphPrism, versão 5.0. Os resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Quantificação dos PBDEs nas amostras de sedimentos

Os resultados obtidos após o procedimento analítico nas amostras de sedimentos da Lagoa do Saibro estão expressos nas tabelas e figuras dessa sessão. No entanto, um dos pontos escolhidos na coleta (ponto 1) não apresentou valores detectáveis de PBDEs e, por isso, foi considerado não representativo. Isto pode ser explicado devido ao tipo de solo recolhido, que neste caso era arenoso e, portanto, apresentava menos material orgânico, responsável pela absorção e acumulação de PBDEs em sedimentos.

Em contraste, as outras amostras 2 e 3 ofereceram valores de concentração em uma faixa de 0,16-2,25 ng.g⁻¹ e 0,35-2,7 ng.g⁻¹, respectivamente, como ilustrado pelos cromatogramas das **figuras 10 e 11** e detalhado na **tabela 8**. Os dados recolhidos mostram a influência do BDE-47, uma vez que este é um congênere muito utilizado na indústria de móveis e estofados (BOTERO *et al.*, 2007), sendo um dos mais encontrados em amostras ambientais. (HITES, 2004; SCHECTER *et al.*, 2004, 2007).

Tabela 8 – Concentração de PBDEs encontrados nas amostras de sedimentos da Lagoa do Saibro – Ribeirão Preto.

Analito	Amostras de sedimentos			
	Ponto 02 (ng g ⁻¹ dw)	SD*	Ponto 03 (ng g ⁻¹ dw)	SD*
BDE-28	0,68	0,04	0,58	0,03
BDE-47	2,10	0,06	2,71	0,14
BDE-66	0,76	0,03	<LQ	-
BDE-100	0,24	0,02	0,80	0,05
BDE-99	0,25	0,02	0,94	0,08
BDE-85	<LQ	-	0,35	0,02
BDE-154	-	-	-	-
BDE-153	-	-	-	-
BDE-138	-	-	-	-
ΣBDEs	4,03		5,38	

*n=3

Figura 9 - Separação cromatográfica da solução padrão de PBDEs.

Solução padrão Lake Michigan Study – Accustandard, 50ng.ml⁻¹ (BDE-28, BDE-47, BDE - 66, BDE-100, BDE -99, BDE -85, BDE-154, BDE-153 e BDE-138)

Figura 10 - Cromatograma da amostra 2.

Presença dos BDEs -47, -66, -100, -99 em tempos de retenção de 33,205; 34,028; 37,011; 38,345 min, respectivamente.

Figura 11 - Cromatograma da amostra 3.

Presença dos BDEs -28, -47, -100, -85 com tempos de retenção de 28,028; 33,205; 37,011; 41,003, respectivamente.

Em geral, os BDEs mais encontrados no meio ambiente são 47, 99, 100, 153, 154 e 183, uma vez que são os principais compostos das misturas comerciais (FARNERUD *et al.*, 2001). Isto porque a mistura penta-BDE, que inclui os BDE-47, -99, -100, -153, -154 (HALE *et al.*, 2001) é tipicamente aplicada em móveis, enquanto a octa e a deca são utilizadas na fabricação de variados tipos de polímeros, especialmente aqueles aplicados em televisores, computadores e cabos (KRÓL *et al.*, 2012).

Desse modo, a presença de PBDEs na região analisada é explicada pelos hábitos de descarte de resíduos domésticos da população circundante. A prefeitura informou, semanas depois desta amostragem, que foi removido do lago meia tonelada de lixo, composto principalmente por móveis e eletrônicos (+ Ribeirão Preto). A presença de tais objetos serviu para contaminar a região com PBDEs, uma vez que estes compostos realizam ligações químicas fracas com o material e, portanto, podem ser facilmente lixiviados, como já explicado. Além disso, os PBDE podem se espalhar pelo ar em forma de partículas que são retiradas da atmosfera através da chuva e depositadas em sedimentos onde se acumulam.

Para uma melhor visualização dos resultados, estes foram comparados às concentrações encontradas em outras áreas ao redor do mundo, através de uma compilação realizada por Wang et al. 2015 (**tabela 9**). As concentrações médias da somatória de PBDEs (Σ PBDEs), excluindo o BDE-209, na Lagoa do Saibro foi maior do que a encontrada, por exemplo, no rio Fuhe, no lago Baiyangdian e no lago Chaohu, todos localizados na China, e maior que na ilha Olkhon, na Rússia. Uma zona económica na China, Cheng-Yu, apresentou uma média muito menor do que foi encontrado na Lagoa do Saibro. Mas em comparação a algumas regiões da Coreia (Quatro Grandes Rios) ou até mesmo da China (Jiaojian River) os valores foram muito menores, o que significa que esta lagoa em Ribeirão Preto tem uma contaminação moderada com PBDEs. Na literatura não foram encontrados estudos sobre quantificações de PBDEs em sedimentos no Brasil.

Tabela 9 - Comparação entre as concentrações de PBDEs (ng/g dw) encontradas em Ribeirão com as de outras regiões do mundo - Adaptado de Wang et al., 2015.

Local	n ^a	ΣPBDEs ^b (média)	Referências
Lagoa do Saibro, Brasil	6	4.03-5.38 (4.70)	Presente projeto
Shanghai, China	52	0.205-119 (7.56)	Wang et al. (2015)
Rio Beijiang, China	10	0.02-186	Chen et al. (2009)
Lago Baiyangdian, China	8	0.05-5.03 (0.78)	Hu et al. (2010)
Rio Fuhe, China	8	0.13-6.39 (2.33)	Hu et al. (2010)
Zona econômica de Cheng, China	19	0.20-6.45 (0.99)	Zhang et al. (2011)
Lago Chaohu, China	16	0.44-12.0 (1.7)	Wang et al. (2012)
Rio Qiantangjiang, China	8	0.067-5.28 (0.701)	Fang (2012)
Lago Taihu, China	26	0.39-34.4 (5.21)	Zhou et al. (2012)
Bacia Hidrográfica de Hai, China	20	0.06-2.10 ^d	Zhao et al. (2012)
Represa três gargantas, China	27	nd-0.146 (0.046 ^c)	Li et al. (2013)
Rio Jiaojiang, China	10	8.93-45.0 (22.3)	Yang et al. (2014)
Lago Maggiore, Itália	8	0.02-27.1	Mariani et al. (2008)
Quatro Grandes Rios, Korea	27	0.46-1760 (55) ^d	Lee et al. (2012)
Lagoa Shihwa, Korea	23	0.16-943	Moon et al. (2012)
Rio Nigara, Canada	17	nd-18	Richman et al. (2013)
Enseada Goseong, Korea	19	0.50-13.9 (5.39) ^d	Lee et al. (2014)
Bacia Hidrogr. Llobregat, Spain	7	1.50-44.3	Barón et al. (2014)
Ilha Olkhon, Russia	40	0.164-0.670 (0.302) ^d	Ok et al. (2013)

nd: não detectado

^a Número de congêneres analisados na amostra

^b Somatória dos congêneres encontrados com exceção do BDE-209

^c Concentração média

^d Concentração total de PBDE incluindo o BDE-209

No entanto não é possível dizer se a concentração encontrada neste estudo é tóxica ou não aos seres vivos porque uma correlação direta é complicada, pois os estudos utilizam diferentes unidades de medida. Além disso, a toxicidade também depende da taxa de absorção e do sistema metabólico das diferentes espécies expostas. No entanto, deve-se ter em mente que os PBDEs se acumulam nos lipídios através da exposição ou pela cadeia alimentar. Este cenário é ilustrado pela **tabela 10**, que apresenta as concentrações de PBDEs encontradas em mamíferos marinhos de determinadas regiões que foram monitoradas por alguns anos. Esta compilação foi realizada por Hites em 2004, no qual constatou-se que as concentrações aumentaram após alguns anos e que estes compostos foram encontrados mesmo em regiões remotas como o ártico canadense. Este fato foi relacionado com o transporte atmosférico de PBDEs de regiões mais poluídas e com a bioacumulação pela cadeia alimentar.

Tabela 10 - Concentrações de PBDEs encontradas em mamíferos marinhos (ng/g lipídio) - Adaptado de Hites, 2004.

Local	Tipo de Amostra	Data	Reps	Σ PBDE	Referencia
Ártico Canadense	Foca, 0-15 anos	1981	7	0.42	Ikonomou et al. (2002)
Ártico Canadense	Foca, 0-15 anos	1991	5	1.63	Ikonomou et al. (2002)
Ártico Canadense	Foca, 16-35 anos	2000	5	1.69	Ikonomou et al. (2002)
Ártico Canadense	Foca, 0-15 anos	1996	9	2.44	Ikonomou et al. (2002)
Ártico Canadense	Foca, 0-15 anos	1996	8	3.17	Ikonomou et al. (2002)
Ártico Canadense	Foca, 16-35 anos	2000	8	4.03	Ikonomou et al. (2002)
Ártico Canadense	Foca, 0-15 anos	2000	7	4.30	Ikonomou et al. (2002)
Suécia	Foca anelada, gordura	1981	7	51.0	Sellström et al. (1993)
São Francisco	Foca	1989	1	87.0	She et al. (2002)
Mar Báltico	Duas espécies de foca	1984	4	114	Haglund et al. (1997)
Ilhas Faroe	Baleia-piloto	1997	6	165	van Bavel et al. (2001)
São Francisco	Foca	1991	2	348	She et al. (2002)
Noruega	Várias espécies	1997	13	574	de Boer et al. (1998)
Canadá	Golfinho	1992	5	612	Ikonomou et al. (2002)
São Francisco	Foca	1993	3	658	She et al. (2002)
Reino Unido	Golfinho, gordura	1999	9	666	Law et al. (2002)
Suécia	Foca, gordura	1982	9	728	Sellström et al. (1993)
São Francisco	Foca	1992	1	783	She et al. (2002)
Reino Unido	Golfinho, gordura	1996	4	1170	Law et al. (2002)
Ilhas Faroe	Baleia Piloto, gordura	1996	5	1560	Lindström et al. (1999)
Reino Unido	Golfinho, gordura	1997	27	1670	Law et al. (2002)
Reino Unido	Golfinho, gordura	1998	20	1670	Law et al. (2002)
São Francisco	Foca	1997	1	1940	She et al. (2002)
Mar do Norte	Duas espécies	1997	12	2070	Boon et al. (2002)
São Francisco	Foca	1998	2	4950	She et al. (2002)

4.2. Análise toxicológica do BDE-209 na presença e ausência de rapamicina.

Outros estudos em nosso laboratório constataram a capacidade de alguns congêneres, isoladamente, provocarem morte celular por apoptose, como foi o caso do BDE-209. Observou-se também que esse desfecho estava relacionado a uma disfunção mitocondrial devido ao acúmulo de espécies reativas provocado pela presença do BDE (PEREIRA et al., 2013; PEREIRA et al., 2014; PAZIN et al., 2015).

Além disso, trabalhos sobre morte celular, encontrados na literatura, demonstraram que a autofagia e a apoptose apresentam uma grande relação de intercomunicação, uma vez que possuem reguladores em comum (**Figura 7**). Dessa

forma, dependendo do dano e dos estímulos aos quais a célula é submetida, esses dois tipos de morte celular podem agir cooperativa ou antagonicamente ou até mesmo como auxiliares em determinados eventos (EISENBERG-LERNER *et. al.*, 2009).

Sendo assim, este projeto almejou avaliar se a indução autofágica, iniciada pela adição de rapamicina, seria capaz de proteger as células HepG2 contra a apoptose, como foi relatado em outros estudos, nos quais a autofagia amenizou os danos provocados pelos xenobióticos (LU, CEDERBAUM, 2015), bem como conseguiu prevenir, em alguns casos, a ocorrência de apoptose (RAVIKUMAR *et al.*, 2006).

Para tal, realizou-se ensaios citotóxicos em células HepG2, as quais foram tratadas com o BDE-209 na presença do indutor autofágico rapamicina. Avaliou-se, então a capacidade protetiva da autofagia no processo apoptótico desencadeado pelo PBDE. Os resultados de cada ensaio estão detalhados nos tópicos seguintes.

4.2.1. Proliferação celular

Neste ensaio observou-se que o BDE-209 não foi capaz de promover decaimento na proliferação das células HepG2 durante os tempos de incubação de 24 e 48 horas. No entanto, todas as concentrações nas quais a rapamicina estava presente mostraram resultados significativos, em comparação ao controle de DMSO, após 48 horas. O controle de rapamicina mostrou o mesmo padrão de influência sobre as células, indicando que o efeito encontrado pode estar relacionado apenas com a rapamicina em si e não por um sinergismo ou antagonismo entre ela e o PBDE.

Figura 12 - Comparação do efeito causado pela presença de rapamicina na toxicidade do BDE-209 em relação a proliferação das células HepG2 após 24 e 48 horas de incubação.

No controle negativo foi adicionado 1,0% DMSO, enquanto no positivo foi administrado terc-butil-hidroperóxido (T-BOOH) a 100 μmol/L. No controle de rapamicina foi adicionada uma solução da mesma de 100 nM, bem como nas concentrações representadas por (R), nas quais há a presença de PBDE e rapamicina. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Como constatado em outro estudo (Yu *et al.*, 2014) a rapamicina inibiu a proliferação deste tipo de célula em torno dos 40% também. Tal efeito deve-se ao bloqueio das atividades da proteína mTOR, que apresenta papel significativo na indução de sobrevivência celular.

4.2.2. Viabilidade Celular (MTT)

Os efeitos causados pelo BDE-209 na viabilidade celular, avaliada pelo ensaio de MTT, seguem a mesma tendência relatada na proliferação das células HepG2. Nenhuma influência foi constatada nas concentrações testadas até 24 horas de incubação. No entanto, após 48 horas, houve uma diminuição da viabilidade na concentração de 25 μmol.L⁻¹ na presença apenas do PBDE. Resultado semelhante foi evidenciado no estudo de Hu *et al.*, 2007, no qual foi avaliada a indução apoptótica pela presença deste

congênere em células HepG2. Porém eles observaram efeitos a partir da concentração de $10\mu\text{mol.L}^{-1}$ em uma tendência tempo-dose dependente.

Nas concentrações nas quais também foram ministradas a rapamicina, todas tiveram a viabilidade diminuída após 48 horas, da mesma forma que seu controle, com diferença na concentração de $25\mu\text{mol.L}^{-1}$, na qual o efeito foi mais acentuado, podendo indicar uma somatória de efeitos. Desse modo, com esses dois ensaios é possível observar que a presença de rapamicina influenciou o ciclo normal da célula e a sua viabilidade, cujo estresse causado provavelmente gerou danos à mitocôndria ativando uma ou algumas das vias de morte celular, como constatado em outros estudos com PBDEs (PEREIRA et al., 2013, 2014).

Figura 13 - Comparação do efeito causado pela presença de rapamicina na toxicidade do BDE-209 em relação a viabilidade das células HepG2 após 24 e 48 horas de incubação.

No controle negativo foi adicionado 1,0% DMSO, enquanto no positivo foi administrado cccp a $10\mu\text{mol/L}$. No controle de rapamicina foi adicionada uma solução da mesma de 100 nM, bem como nas concentrações representadas por (R), nas quais há a presença de PBDE e rapamicina. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p<0,001, **p<0,01 e *p<0,05.

4.2.3. Fragmentação e Condensação Celular

Para evidenciar a presença de morte por apoptose realizou-se o ensaio de fragmentação e condensação celular por ser esta uma característica morfológica de células em processo apoptótico. Resultados significativos foram encontrados em ambas concentrações de $25\mu\text{mol.L}^{-1}$ em 24 horas de incubação, no entanto, no tempo de 48 horas foi observado o mesmo efeito apenas na de $25\mu\text{mol.L}^{-1}$ na presença de rapamicina.

Apesar do resultado anômalo entre os dois tempos de incubação, uma vez que se esperava um resultado tempo-dependente, é possível observar uma tendência na qual a mudança morfológica descrita não ocorre até que se atinja a maior concentração testada, mesmo na presença de rapamicina. Isto indica que os dados encontrados nos ensaios anteriores, nas concentrações com rapamicina, provavelmente não apresentam relação significativa com morte por apoptose, dado este que pode ser sustentado por um ensaio de exposição da fosfatidilserina a membrana externa.

Figura 14 - Efeito da indução autofágica em relação a toxicidade do BDE-209 em causar fragmentação ou condensação nuclear após tempos de exposição de 24 e 48 horas.

No controle negativo utilizou-se 1,0% de DMSO e no controle positivo, cisplatina a $0,25\text{ mg.mL}^{-1}$. No controle de rapamicina foi adicionada uma solução da mesma de 100 nM, bem como nas concentrações representadas por (R), nas quais há a presença de PBDE e rapamicina. Trezentas células foram analisadas por lâmina e os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com *** $p<0,001$, ** $p<0,01$ e * $p<0,05$.

Figura 15 - Característica morfológica de células fragmentadas e condensadas.

Células fragmentadas e condensadas observadas após tempos de exposição de 24 e 48 horas. As células foram coradas com Hoechst 33342 e as imagens obtidas por microscopia de flueorescência em lente objetiva de 40x. As setas indicam a morfologia típica de células fragmentadas ou condensadas.

4.2.4. Ciclo celular

A autofagia, como mecanismo de defesa, tem a característica de parar o ciclo celular com o intuito de reparar o dano provocando ou então de impedir que este perpetue nas células-filhas. Dessa forma, para avaliar a influência do processo autofágico nos efeitos citotóxicos do BDE, realizou-se o ensaio de ciclo celular.

Figura 16 - Efeito da rapamicina e do BDE-209 sobre o ciclo celular das HepG2 em 24 horas de exposição.

Figura 17 - Efeito da rapamicina e do BDE-209 sobre o ciclo celular das HepG2 em 48 horas de exposição.

No controle negativo foi adicionado 1,0% DMSO, enquanto no positivo foi administrado cccp a 10 $\mu\text{mol/L}$. No controle de rapamicina foi adicionada uma solução da mesma de 100 nM, bem como nas concentrações representadas por (R), nas quais há a presença de PBDE e rapamicina. Os gráficos representam média de triplicatas e demonstram as fases G1, S e G2. A comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ (Fig. 16 e 17).

Os resultados obtidos mostram que há um sutil sequestro das células na fase G2 na presença de rapamicina, apesar de terem sido observados valores significativos apenas nas duas concentrações de 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em 48 horas. Esta parada no ciclo na fase G2 indica uma tentativa de reparo de DNA replicado na fase S, dano este provavelmente causado devido ao acúmulo de EROs como já observados em outros estudos em nosso laboratório (SOUZA, *et al.*, 2016). Quando o reparo não é possível, a célula ativa uma de suas vias de morte para que assim o dano não se propague.

4.2.5. Exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana celular

Como já citado, para avaliar o tipo de morte que estava ocorrendo e a influência da autofagia na capacidade do PBDE em ativar a apoptose, realizou-se o ensaio de Anexina.

Figura 18 - Exposição da fosfatidilserina a face externa da membrana celular e a incorporação de PI após tempo de exposição de 48 horas.

No controle negativo utilizou-se 1,0% de DMSO e no controle positivo, cisplatina a 25 mg.mL⁻¹. No controle de rapamicina foi adicionada uma solução da mesma de 100 nM, bem como nas concentrações representadas por (R), nas quais há a presença de PBDE e rapamicina. Os gráficos representam os valores encontrado em apenas uma triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p<0,001, **p<0,01 e *p<0,05.

Constatou-se que os efeitos observados na concentração de 25 µmol.L⁻¹ com apenas o BDE ativou a via de morte celular por apoptose. No entanto, o mesmo não ocorreu na presença de rapamicina, na qual a apoptose mostra-se bem baixa enquanto a necrose apresenta resultado significativo. Por outro lado, a concentração de 10 µmol.L⁻¹ com rapamicina inferiu morte por apoptose, indicando que uma via mais drástica como a necrose ocorre apenas em uma maior concentração do BDE. Nikolettou e colaboradores mostraram as possíveis vias de intercomunicação entre as mortes celulares e descreveram que a enzima PARP1 está associada ao reparo de dano ao DNA e que sua ativação induz necrose e previne apoptose. Desse modo, a presença de danos ao DNA anteriormente observados e de estresse oxidativo podem ter ativado essa enzima gerando necrose na concentração na qual estava presente a rapamicina, pois o excesso de autofagia pode estar interferindo e bloqueando a apoptose e acentuando a necrose na tentativa de reparar o dano e levar a célula à morte (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013).

5. CONCLUSÃO

A quantificação dos sedimentos na Lagoa do Saibro mostrou que a região apresenta um nível de contaminação mediana por PBDEs, devido a presença de seis congêneres (BDE-28, -47, -66, -85, -99, -100) em uma concentração total média de 3,65 ng.g⁻¹.

Os resultados obtidos nos ensaios citotóxicos de SRB e MTT mostraram que o BDE-209 foi capaz apenas de diminuir a viabilidade celular nas concentração de 25 µmol.L⁻¹ no intervalo de 48 horas.

A presença de rapamicina diminui o proliferação e a viabilidade em todas as concentrações em que foi adicionada, sem aparente interação com o PBDE nas concentrações baixas.

Os ensaios de fragmentação celular de exposição da fosfatidilserina mostraram que o BDE só é capaz de promover a apoptose na concentração de 25 µmol.L⁻¹, porém na presença do indutor autofágico, a apoptose é inibida, enquanto um processo de necrose é observado nessa mesma concentração. Portanto, a indução autofágica não acarretou em proteção da célula, mas sim agravou a inviabilidade destas.

A capacidade de causar morte por apoptose do BDE-209 na concentração de 10 µmol.L⁻¹ não foi conclusiva pelos resultados encontrados neste projeto.

6. BIBLIOGRAFIA

+ Ribeirao Preto – <http://www.maisribeiraopreto.com.br/noticias/prefeitura-faz-limpeza-geral-na-lagoa-do-saibro-2345> (acessado em 09/08/16)

ATKIN-SMITH, G. K.; TIXEIRA, R.; PAONE, S.; MATHIVANAN, S.; COLLINS, C.; LIEM, M.; GOODALL, K. J.; RAVICHANDRAN, K. S.; HULETT, M. D; POON, I. K. H. A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure. **Nature Communications**, 2015.

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Draft toxicological profiles for polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), 2015. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp207.pdf> (acessado em 6/2016).

BARÓN, E., SANTÍN, G., ELJARRAT, E., BARCELÓ, D. Occurrence of classic and emerging halogenated flame retardants in sediment and sludge from Ebro and Llobregat river basins (Spain). **Journal of Hazardous Materials**, v. 265, p. 288–295, 2014.

BEHRENDTS, C.; SOWA, M. E.; GYGI, S. P.; HARPER, J. W. et al. Network organization of the human autophagy system. **Nature**, v. 466, p. 68-76, 2010.

BERGHE, T. V.; LINKERMANN, A.; JOUAN-LANHOUE, S.; WALCZAK, H.; VANDENABEELE, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 135-147, 2014.

BIRNBAUM, L. S.; STASKAL, D. F. Brominated flame retardants: Cause for concern? **Environmental Health Perspectives**, v. 112, p. 9-17, 2004.

BOER, J. de; WESTER, P. G.; KLAMER, H. J.; LEWIS, W. E.; BOON, J. P. Do flame retardants threaten ocean life? **Nature**, v. 394, p. 28-29, 1998.

BONN, J. P. et al. Levels of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants in animals representing different trophic levels of the North Sea food Web. **Environmental Science & Technology**, **36** (19), p. 4025-4032, 2002.

BOTARO, D.; TORRES, J. P. M. Difenil éteres polibromados (PBDEs) – Novos poluentes, antigos desafios. **Oecologia brasiliensis**, v. 11, p. 167-178, 2007.

BRANCHI, I.; ALLEVA, E.; COSTA, L. G. Effects of perinatal exposure to a polybrominated diphenyl ether (PBDE 99) on mouse neurobehavioural development. **NeuroToxicology**, v. 23, p. 375–384, 2002.

BRANCHI, I.; CAPONE, F.; ALLEVA, E.; COSTA, L. G. Polybrominated diphenyl ethers: neurobehavioral effects following developmental exposure. **Neurotoxicology**, v. 24, p. 449–462, 2003.

CALSTRETTI, A.; RANCATI, F.; CERIANI, M. C.; ASNAGHI, L.; CANTI, G.; NICOLIN, A. Rapamycin increases the cellular concentration of the BCL-s protein and exerts an anti-apoptotic effect. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. 2121-2128, 2001.

CARLONI, S.; BUONOCORE, G.; BALDUINI, W. Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. **Neurobiology of Disease**, v. 32, p. 329-339, 2008.

CARLONI, S.; BUONOCORE, G.; LONGINI, M.; PROIETTI, F.; BALDUINI, W. Inhibition of rapamycin-induced autophagy causes necrotic cell death associated with BAX/BAD mitochondrial translocation. **Neuroscience**, v. 203, p. 160-169, 2012.

CETIN, B.; ODABASI, M. Particle-phase dry deposition and air-soil gas-exchange of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Izmir, Turkey. **Environmental Science Technology**, v. 41, p. 4986-4992, 2007.

CHEN L., WILLIS S. N., WEI A., SMITH B. J., FLETCHER J. I., HINDS M. G., COLMAN P. M., DAY C. L., ADAMS J. M., HUANG D. C. S. Differential targeting of pro-survival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. **Molecular Cell**, v. 17, 393-403, 2005.

CHEN, L.; HUANG, Y.; PENG, X.; XU, Z.; ZHANG, S.; REN, M.; YE, Z.; WANG, X. PBDEs in sediments of the Beijiang River, China: levels, distribution, and influence of total organic carbon. **Chemosphere**, v. 76 (2), p. 226-231, 2009.

COSTA, L. G.; GIORDANO, G.; TAGLIAFERRI, S.; CAGLIERI, A.; MUTTI, A. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants: environmental contaminants, human body burden and potential adverse health effects. **Acta Biomedica**, v. 79, p. 172-183, 2008.

CUNHA, S. C.; KALACHOVA, K.; PULKRABOVA, J.; FERNANDES, J. O.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; ALVES, A.; HAJŠLOVA, J. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) contents in house and car dust of Portugal by pressurized liquid extraction (PLE) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Chemosphere**, v. 78, p. 1263-1271, 2010.

DAERP - Departamento De Água e Esgoto de Ribeirão Preto.
<http://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/daerp/i04principal.php> (acessado 06/2016)

DARNERUD, P. O.; ERIKSEN, G. S.; JÓHANNESSON, T.; LARSEN, P. B.; VILUKSELA, M. Polybrominated Diphenyl Ethers: Occurrence, Dietary Exposure, and Toxicology. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 49-68, 2001.

DAUBIÉ, S.; BISSON, J. F.; LALONDE, R.; SCHROEDER, H.; RYCHEN, G. Neurobehavioral and physiological effects of low doses of polybrominated diphenyl ether (PBDE)-99 in male adult rats. **Toxicology Letters**, v. 204 p. 57-63, 2011.

DE LA CAL, A.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. Determination of 39 polybrominated diphenyl ether congeners in sediment samples using fast selective pressurized liquid extraction and purification. **Journal of Chromatography A**, v. 1021, p. 165–173, 2003.

DE WIT, C. A. An overview of brominated flame retardants in the environment. **Chemosphere**, v. 46, p. 583–624, 2002.

DENNIS, P. B.; JAESCHKE, A.; SAITOH, M.; FOWLER, B.; KOZMA, S. C.; THOMAS, G. Mammalian TOR: A Homeostatic ATP Sensor. **Science**, v. 294, p. 1102–1105, 2001.

DUAN, Y.; XU, H.; LUO, X.; ZHANG, H.; HE, Y.; SUN, G.; SUN, Z. Procyanidins from *Nelumbo nucifera* Gaertn. Seedpod induce autophagy mediated by reactive oxygen species generation in human hepatoma G2 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 79, p. 135–152, 2016.

EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, p. 663–669, 2004.

EISENBERG-LERNER, A.; BIALIK, S.; SIMON, H. U.; KIMCHI, A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, p. 966–975, 2009.

ELJARRAT, E.; DE LA CAL, A.; LARRAZABAL, D.; FABRELLAS, B.; FERNANDEZ-ALBA, A. R.; BORRULL, F.; MARCE, R. M.; BARCELO, D. Occurrence of polybrominated diphenylethers, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and biphenyls in coastal sediments from Spain. **Environmental Pollution**, v. 136, p. 493–501, 2005.

ENGELMAN, J. A.; LUO, J.; CANTLEY, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinase as regulators of growth and metabolism. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, p. 606–619, 2006.

EPA, Environmental Protection Agency. Emerging Contaminants – Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDE) and Polybrominated Biphenyls (PBB), 2008.

ERIKSSON, P. ; JAKOBSSON, E.; FREDRIKSSON, A. Brominated flame retardants: a novel class of developmental neurotoxicants in our environment? **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 903–908, 2001.

ERIKSSON, P. VIBERG, H.; JAKOBSSON, E.; ORN, U.; FREDRIKSSON, A. A brominated flame retardant, 2,2',4,4',5- pentabromodiphenyl ether: uptake, retention, and induction of neurobehavioral alterations in mice during a critical phase of neonatal brain development. **Toxicological Science**, v. 67, p. 98–103, 2002.

ERLICH, S.; ALEXANDROVICH, A.; SHOHAMI, E.; PINKAS-KRAMARSKI, R. Rapamycin is a neuroprotective treatment for traumatic brain injury. **Neurobiology of Disease**, v. 26, p. 86–93, 2007.

FALCONE, C.; MAZZONI, C. External and internal triggers of cell death in yeast. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, p. 2237-2250, 2016.

FANG, L. Contamination characteristics of halogenated flame retardants in surficial soils and sediments from Zhejiang Province, China. Master Thesis. Ningbo, Zhejiang, China, Zhejiang University of Technology, 2012.

FAVALORO, B.; ALLOCATI, N.; GRAZIANO, V.; ILIO, C. Di, LAURENZI, V. De. Role of apoptosis in disease. **AGING**, v. 4 (5), p. 330-349, 2012.

FROMME, H.; KÖRNER, W.; SHAHNIN, N.; WANNER, A.; ALBRECHT, M.; BOEHMER, S.; PARLAR, H.; MAYER, R.; LIEBL, B.; BOLTE, G. Human exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDE), as evidenced by data from a duplicate diet study, indoor air, house dust, and biomonitoring in Germany. **Environment International**, v. 35, p. 1125–1135, 2009.

FROUIN, H.; LEBEUF, M.; HAMMILL, M.; MASSON, S.; FOURNIER, M. . Effects of individual polybrominated diphenyl ether (PBDE) congeners on harbor seal immune cells in vitro. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, p. 291-298, 2010.

GALLO, J. B.; ANGNELLI, A. M. Aspectos do comportamento de polímeros em condições de incêndio. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 23-38, 1998.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M. O.; KEPP, O.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A; LU, X.; MADEO, F.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, p. 107-120, 2012.

GOHIL, K.; CHAKRABORTY, A. A. Applications of microarray and bioinformatics tools to dissect molecular responses of the central nervous system to antioxidant micronutrients. **Nutrition**, v. 20, p. 50-55, 2004.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, p. 335-343, 2007.

GUÉGUEN, F.; STILLE, P.; MILLET, M. Optimisation and application of accelerated solvent extraction and flash chromatography for quantification of PCBs in tree barks and XAD-2 passive samplers using GC–ECD with dual columns. **Talanta**, v. 111, p. 140–146, 2013.

HAGLUND, P. S.; ZOOK, D. R.; BUSER, H. R.; HU, J. Identification and quantification of polybrominated diphenyl ethers and methoxy-polybrominated diphenyl ethers in Baltic biota. **Environmental Science & Technology**, v. 31, p. 3281- 3287, 1997.

HALE, R. C. La GUARDIA, M. J.; HARVEY, E. P.; MAINOR, T. M.; DUFF, W. H.; GAYLOR, M. O. Polybrominated Diphenyl Ether Flame Retardants in Virginia

Freshwater Fishes (USA). **Environmental Science & Technology**, v. 35, p. 4585–4591, 2001.

HAPPO, L.; STRASSER, A.; CORY, S. BH3-only proteins in apoptosis at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 125, p. 1081-1087, 2012.

HARDY, M.L. A comparison of the properties of the major commercial PBDPO/PBDE product to those of major PBB and PCB products. **Chemosphere**, v. 46, p. 717–728, 2002.

HE, P.; WANG, A. G.; XIA, T.; GAO, P.; NIU, Q.; GUO, L. J.; CHEN, X. M. Mechanisms underlying the developmental neurotoxic effect of PBDE-47 and the enhanced toxicity associated with its combination with PCB153 in rats. **NeuroToxicology**, v. 30, p. 1088–1095, 2009.

HITES, R. A. Polybrominated Diphenyl Ethers in the Environment and in People: A Meta-Analysis of Concentrations. **Environmental Science & Technology**, v. 38 (4), p. 945-956, 2004.

HOH, E., HITES, R. A. Brominated flame retardants in the atmosphere of the east-central United States. **Environmental Science Technology**, v. 39, p. 7794-7802, 2005.

HOOPER, K.; MCDONALD, T. A. The PBDEs: an emerging environmental challenge and another reason for breast-milk monitoring programs. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, p. 387–392, 2000.

HU, G.; XU, Z.; DAI, J.; MAI, B.; CAO, H.; WANG, J.; SHI, Z.; XU, M. Distribution of polybrominated diphenyl ethers and decabromodiphenylethane in surface sediments from Fuhe River and Baiyangdian Lake, North China. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, p. 1833-1839, 2010.

HU, X.; HU, D.; XU, Y. Effects of tetrabrominated diphenyl ether and hexabromocyclododecanes in single and complex exposure to hepatoma HepG2 cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, p. 327–337, 2009.

HU, X. Z.; XU, Y.; HU, D. C.; HUI, Y.; YANG, F. X. Apoptosis induction on human hepatoma cells Hep G2 of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209). **Toxicology Letters**, v. 171, p. 19–28, 2007.

HYÖTYLÄINEN, ; HARTONEN, K. Determination of brominated flame retardants in environmental samples. **Trends in analytical chemistry**, vol. 21 (1), p. 13-29, 2002.

IKONOMOU, M. G.; RAYNE, S.; FISCHER, M.; FERNANDEZ, M. P.; CRETNEY, W. Occurrence and congener profiles of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in environmental samples from coastal British Columbia, Canada. **Chemosphere**, v. 46, p. 649-663, 2002.

IKONOMOU, M. G.; RAYNE S.; ADDISON R. F. - Exponential Increases of the Brominated Flame Retardants, Polybrominated Diphenyl Ethers, in the Canadian Arctic from 1981 to 2000. **Environmental Science & Technology**, v. 36, p. 1886-1892, 2002.

INDRAN, I. R.; TUFO, G.; PERVAIZ, S.; BRENNER, C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1807, p. 735–745, 2011.

INOUE, K.; HARADA, K.; TAKENAKA, K.; UEHARA, S.; KONO, M.; SHIMIZU, T.; TAKASUGA, T.; SENTHILKUMAR, K.; YAMASHITA, F.; KOIZUMI, A.. Levels and concentration ratios of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in serum and breast milk in Japanese mothers. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 1179-1185, 2006.

JIANG, Y.; WANG, X.; ZHU, K.; WU, M.; SHENG, G.; FU, J. Occurrence, compositional profiles and possible sources of polybrominated diphenyl ethers in urban soils of Shanghai, China. **Chemosphere**, v. 80, p. 131–136, 2010.

JONES-OTAZO, H. A.; CLARKE, J. P.; DIAMOND, M. L.; ARCHBOLD, J. A.; FERGUSON, G.; HARNER, T.; RICHARDSON, G. M.; RYAN, J. J.; WILFORD, B. Is house dust the missing exposure pathway for PBDEs? An analysis of the urban fate and human exposure to PBDEs. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 5121-5130, 2005.

KIM, ; RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, ; LEMASTERS,. Minireview: Selective Degradation of Mitochondria by Mitophagy. **Arch Biochem Biophys**, p. 245–253, 2007.

KLAMER, H. J. C.; LEONARDS, P. E. G.; LAMOREE, M. H.; VILLERIUS, L. A.; AKERMAN, J. E.; BAKKER, J. F. A chemical and toxicological profile of Dutch North Sea surface sediments. **Chemosphere**, v. 58, p. 1579-1587, 2005.

KLIONSKY, D. J.; EMR, S. D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. **Science**, v. 290, p. 1717-1721, 2000.

KRÓL, ; ZABIEGAŁA, B.; NAMIESNIK, J. PBDEs in environmental samples: Sampling and analysis. **Talanta**, v. 93, p. 1-17, 2012.

KRYSKO, D. V.; BERGHE, T. V.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, p. 205-221, 2008.

KURIYAMA, S. N.; TALSNESS, C. E.; GROTE, K.; CHAHOUD, I. Developmental Exposure to Low-Dose PBDE-99: Effects on Male Fertility and Neurobehavior in Rat Offspring. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, p. 149-154, 2005.

KWON, S.; JEON, J. S.; KIM, S. B.; HONG, Y. K.; AHN, C.; SUNG, J. S.; CHOI, I. Rapamycin up-regulates triglycerides in hepatocytes by down-regulating Prox1. **Lipids in Health and Disease**, v.27, 2016.

LACORTE, S.; IKONOMOU, M. G.; FISCHER, M. A comprehensive faz chromatography coupled to high resolution mass spectrometry based method for determination of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated and

methoxylated metabolites in environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 337-347, 2010.

LAW, R. J.; ALLCHIN, C. R.; BENNETT, M. E.; MORRIS, S.; ROGAN, E. Polybrominated diphenyl ethers in two species of marine top predators from England and Wales. **Chemosphere**, v. 46, p. 673-681, 2002.

LEE, H. J.; AN, S.; KIM, G. B. Background level and composition of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in creek and subtidal sediments in a rural area of Korea. **Science of the Total Environment**, v. 470-471, p. 1479-1484, 2014.

LEE, I. S.; KIM, K. S.; KIM, S. J.; YOON, J. H.; CHOI, K. H.; CHOI, S. D.; OH, J. E. Evaluation of mono- to deca-brominated diphenyl ethers in riverine sediment of Korea with special reference to the debromination of DeBDE209. **Science of the Total Environment**, v. 432, p. 128-134, 2012.

LEE, I. S.; KANG, H. H.; KIM, U. J.; OH, J. E. Brominated flame retardants in Korean river sediments, including changes in polybrominated diphenyl ether concentrations between 2006 and 2009. **Chemosphere**, v. 126, p. 18-24, 2015.

LEE, L. K.; HE, J. Reductive debromination of polybrominated diphenyl ethers by anaerobic bacteria from soils and sediments. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, p. 798-802, 2010.

LEVCHIK, S. V.; WEIL, E. D. Review. New developments in flame retardancy of styrene thermoplastics and foams. **Polymer International**, v. 57, p. 431-448, 2008.

LEVINE, B.; YUAN, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 2679-2688, 2005.

LI, K. ZHAO, G. F.; ZHOU, H. D.; LIU, X. R.; YU, L. Q.; WEN, W.; ZHANG, P. W. Distribution characteristics of PBDEs in surface sediment from the three Gorges Reservoir of Yangtze River. **Environmental Science**, v. 34, p. 2198-2204, 2013.

LIANG, S. X.; GAO, H. X.; ZHAO, Y. Y.; MA, X. M.; SUN, H. W. Effects of repeated exposure to decabrominated diphenyl ether (BDE-209) on mice nervous system and its self repair. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 29, p. 297-301, 2010.

LIN, L.; BAEHRECKE, E. H. Autophagy, cell death, and cancer. **Molecular & Cellular Oncology**, 2 (3), 2015.

LINDSTRÖM, G.; WINGDORS, H.; DAM, M.; VAN BAVEL, B. Identification of 19 polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in long-finned pilot whale (*Globicephala melas*) from the Atlantic. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 36, p. 355-363, 1999.

LU, Y.; CEDERBAUM, A. Autophagy Protects against CYP2E1/Chronic Ethanol-Induced Hepatotoxicity. **Biomolecules**, v. 5, p. 2659-2674, 2015.

MADIA, F.; GIORDANO, G.; FATTORI, V.; VITALONE, A.; BRANCHI, I.; CAPONE, F.; COSTA, L. G. Differential in vitro neurotoxicity of the flame retardant

PBDE-99 and of the PCB Aroclor 1254 in human astrocytoma cells. **Toxicology Letters**, v. 154 , p. 11–21, 2004.

MAGALHÃES, C. A.; TANIGUCHI, S.; CASCAES, M. J.; MONTONE, R. C. PCBs, PBDEs and organochlorine pesticides in crabs *Hepatus pudibundus* and *Callinectes danae* from Santos Bay, State of São Paulo, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 662-667, 2012.

MARIANI, G.; CANUTI, E.; CASTRO-JIMÉNEZ, J.; CHRISTOPH, E. H.; EISENREICH, S. J.; HANKE, G.; SKEJO, H.; UMLAUF, G. Atmospheric input of POPs into Lake Maggiore (Northern Italy): PBDE concentrations and profile in air, precipitation, settling material and sediments. **Chemosphere**, v. 73, p. 114–121, 2008.

MASSEY, A. C.; ZHANG, C.; CUERVO, A. M. Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 73, p 205-235, 2006.

MCDONALD, T. A. A perspective on the potential health risks of PBDEs. **Chemosphere**, v. 46, p. 745-755, 2002.

MESSER, A. Mini-review: Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants as potential autism risk factors. **Physiology & Behavior**, v. 100, p. 245–249, 2010.

MICHEL , S. WANET, A.; DE PAUW, A.; ROMMELAERE, G.; ARNOULD, T.; RENARD, P. Crosstalk between mitochondrial (dys)function and mitochondrial abundance. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, p. 2297–2310, 2012.

MIZUSHIMA, N.; LEVINE, B.; CUERVO, A.M.; KLIONSKY, D. J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature**, v. 28, p. 1069-1075, 2008.

MOON, H. B.; CHOI, M.; YU, J.; JUNG, R. H.; CHOI, H. G. Contamination and potential sources of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in water and sediment from the artificial Lake Shihwa, Korea. **Chemosphere**, v. 88, p. 837–843, 2012.

NAMIEMIK, ; ZYGMUNT,. Selected concentration techniques for gas chromatographic analysis of environmental samples. **Chromatographia Supplement**, **56**, p. 8-18, 2002.

NIKOLETOPOULOU, V.; MARKAKI, M.; PALIKARAS, K.; TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1833**, p. 3448-3459, 2013.

PAN, T.; RAWAL, P.; WU, Y.; XIE, W.; JANKOVIC, J.; LE, W. Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction. **Neuroscience**, v. 164, p. 541-551, 2009.

PEREIRA, L. C.; DE SOUZA, A. O.; DORTA, D. J. Polybrominated diphenyl ether congener (BDE-100) induces mitochondrial impairment. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 112, p. 418–424, 2013.

PEREIRA, L. C.; MIRANDA, L. F.; DE SOUZA, A. O.; DORTA, D. J. et al. BDE-154 induces mitochondrial permeability transition and impairs mitochondrial bioenergetics. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 77, p. 24-36, 2014.

PEREIRA, L. C.; DUARTE, F. V.; VARELA, A. T. I. F.; ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M. M.; DORTA, D. J. An autophagic process is activated in HepG2 cells to mediate BDE-100-induced toxicity. **Toxicology**, 2016.

PÖHLEIN, M.; BERTRAN, R. U.; WOLF, M.; VAN ELDIK, R. Versatile and fast gas chromatographic determination of frequently used brominated flame retardants in styrenic polymers. **Journal of Chromatography A**, v. 1203, p. 217–228, 2008.

RICHMAN, L. A.; KOLIC, T.; MACPHERSON, K.; FAYEZ, L.; REINER, E. Polybrominated diphenyl ethers in sediment and caged mussels (*Elliptio complanata*) deployed in the Niagara River. **Chemosphere**, v. 92, p.778–786, 2013.

RAVIKUMAR, B.; BERGER, Z.; VACHER, C.; O'KANE, C. J.; RUBINSZTEIN, D. C. Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis. **Human Molecular Genetics**, v. 15, p. 1209-1216, 2006.

REGGIORI, ; KLIONSKY,. Autophagy in the Eukaryotic Cell. **Eukaryotic Cell**, p. 11–21, 2002.

REISTAD, T.; FONNUM, F.; MARIUSSEN, E. Neurotoxicity of the pentabrominated diphenyl ether mixture, DE-71, and hexabromocyclododecane (HBCD) in rat cerebellar granule cellsin vitro. **Archives of Toxicology**, v. 80, p. 785–796, 2006.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. Respostas celulares ao estresse e aos estímulos tóxicos: adaptação, lesão e morte. In:____.Patologia - Bases patológicas das doenças. Versão tarduzida. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier Editora Ltda, 2010, cap 1, p. 3-42.

RODRIGUES, E. M., et al. The occurrence of polybrominated diphenyl ethers in Brazil: a review. **Int. J. Environment and Health**,7, 3, p. 247- 266, 2015

SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 758, p. 80-92, 2013.

SCHECTER, A.; PÄPKE, O.; TUNG, K. C.; STASKAL, D.; BIRNBAUM, L. . Polybrominated diphenyl ethers contamination of United States food. **Environmental Science & Technology**, v. 38, p. 5306-5311, 2004.

SCHECTER, A.; PAVUK, M.; PÄPKE, O.; RYAN, J. J.; BIRNBAUM, L.; ROSEN, R. Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in U.S. Mothers' Milk. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, p. 1723-1729, 2003.

SCHECTE, A.; PÄPKE, O.; HARRIS, T. R.; TUNG, K. C.; MUSUMBA, A.; OLSON, J.; BIRNBAUM, L. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) levels in an expanded market basket survey of U.S. food and estimated PBDE dietary intake by age and sex. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 1515-1520, 2006.

SEGEV, O.; KUSHMARO, A.; BRENNER, A. Environmental Impact of Flame Retardants (Persistence and Biodegradability). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, p. 478-491, 2009.

SELLSTRÖM, U.; JANSSON, B.; KIERKEGAARD, A.; DE WIT, C.; ODSJÖ, T.; OLSSON, M. Polybrominated diphenyl ethers (PBDE) in biological samples from the Swedish environment. **Chemosphere**, v. 26, p. 1703-1718, 1993.

SHE, J.; PETREAS, M.; WINKLER, J.; VISITA, P.; MCKINNEY, M.; KOPEC, D. PBDEs in the San Francisco Bay Area: measurements in harbor seal blubber and human breast adipose tissue. **Chemosphere**, v. 46(5), p. 697-797, 2002.

SIBOV, T. T.; MIYAKI, L. A. M.; MAMANI, J. B.; MARTI, L. C.; SARDINHA, L. R.; PAVON, L. F.; OLIVEIRA, D. M.; CARDENAS, W. H.; GAMARRA, L. F. Evaluation of umbilical cord mesenchymal stem cell labeling with superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with dextran and complexed with Poly-L-lysine. **Einstein (São Paulo)**, v. 10, p. 180-188, 2012.

SILVA, F. de P.; KIANG, C. H.; CAETANO-CHANG, M. R.; SINELLI, O. Arcabouço geológico e hidrofacies do Sistema Aquífero Guarani, no município de Ribeirão Preto (SP). **Revista Brasileira de Geociências**, v. 38, p. 56-67, 2008.

SJÖDIN, A.; HAGMAR, L.; KLASSON-WEHLER, E.; KRONHOLM-DIAB, K.; JAKOBSSON, E.; BERGMAN, A. Flame retardant exposure: polybrominated diphenyl ethers in blood from Swedish workers. **Environmental Health Perspect**, v.107, p. 643-648, 1999.

SJÖDIN, A.; CARLSSON, H.; THURESSON, K.; SJÖLIN, S.; BERGMAN, A.; OSTMAN, C. Flame retardants in indoor air at an electronics recycling plant and at other work environments. **Environmental Science Technology**, v. 35, p. 448-54, 2001.

SOUZA, A. O.; PEREIRA, L. C.; OLIVEIRA, D. P.; DORTA, D. J. BDE-99 congener induces cell death by apoptosis of human hepatoblastoma cell line – HepG2. **Toxicology in Vitro**, v. 27, p. 580-587, 2013.

SOUZA, A. O.; TASSO, M. J.; OLIVEIRA, A. M. C.; PEREIRA, L. C.; DUARTE, F. V.; OLIVEIRA, D. P.; PALMEIRA, C. M.; DORTA, D. J. Evaluation of polybrominated diphenyl ether toxicity on HepG2 - Hexabrominated congener (BDE-154) is less toxic than tetra-brominated congener (BDE-47). **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 2015.

STAPLETON, H. M., DODDER, N.G., OFFENBERG, J.H., SCHANTZ, M. M., WISE, S. A. Polybrominated diphenyl ethers in house dust and clothes dryer lint. **Environmental Science Technology**, v. 39, p. 925-931, 2005.

TADOKORO, D.; TAKAHAMA, S.; SHIMIZU, K.; HAYASHI, S.; ENDO, Y.; SAWASAKI, T. Characterization of a caspase-3-substrate kinome using an N- and C-terminally tagged protein kinase library produced by a cell-free system. **Cell Death Disease**, v. 28, e. 89, 2010.

TALNESS, C. E. An overview of Toxicological aspects of Polibrominated diphenyl ethers a flame-retardant additive in several consumer products. **Environmental Research**, v. 108, p. 158-167, 2008.

THORENZ, U. R.; MUSA BANDOWE, B. A.; SOBOCKA, J.; WILCKE, W. Method optimization to measure polybrominated diphenyl ether (PBDE) concentrations in soils of Bratislava, Slovakia. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 2208-2217, 2010.

TOLKOVSKY A. M. Mitophagy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1793, p. 1508-1515, 2009.

TRUMP, B. F.; BEREZESKY, I. K.; CHANG, S. H.; PHELPS, P. C. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. **Toxicologic Pathology**, v. 25, p. 82-88, 1997.

VIBERG, ; FREDRIKSSON, ; ERIKSSON,. Deranged spontaneous behaviour and decrease in cholinergic muscarinic receptors in hippocampus in the adult rat, after neonatal exposure to the brominated flame-retardant, 2,2',4,4', 5-pentabromodiphenyl ether (PBDE 99). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 20, p. 283–288, 2005.

VONDERHEIDE, A. P.; MÜLLER, K. E.; MEIJA, J.; WELSH, G. L. Polybrominated diphenyl ethers: causes for concern and knowledge gaps regarding environmental distribution, fate and toxicity. **Science of the Total Environment** v. 400, p. 425-436, 2008.

WANG, C.W.; KLIONSKY, D. J. The molecular mechanism of autophagy. **Molecular Medicine**, v. 9, p. 65-76, 2003.

WANG, L.; ZOU, W.; ZHONG, Y.; AN, J.; ZHANG, X.; WU, M.; Yu, Z. The hormesis effect of BDE-47 in HepG₂ cells and the potential molecular mechanism. **Toxicology Letters**, v. 209, p. 193-201, 2012.

WANG, J. Z.; LIU, L. Y.; ZHANG, K.; LIANG, B.; LI, G. L.; CHEN, T. H. Halogenated organic contaminants (HOCs) in sediment from a highly eutrophicated lake, China: occurrence, distribution and mass inventories. **Chemosphere**, v. 89 (8), p. 1003-1008, 2012.

WANG, X. T.; CHEN, L.; WANG, X. K.; ZHANG, Y.; ZHOU, J.; XU, S. Y.; SUN, Y. F.; WU, M. H. Occurrence, profiles, and ecological risks of polybrominated diphenyl ethers (PBDESs) in river sediments of Shanghai, China. **Chemosphere**, v. 133, p. 22-30, 2015.

WANNER, S.; CHANEL, I. Determination of Polybrominated Diphenylethers (PBDE) in Sediment and Sewage Sludge. Agilent Technologies, 2004.

WEI, R. G.; ZHAO, Y. X.; LIU, P. Y.; QIN, Z. F.; YAN, S. S.; LI, Y.; QIN, X. F.; XIA, X. J.; XU, X. B.; YAN, M. C. Determination of environmentally relevant exposure concentrations of polybrominated diphenyl ethers for in vitro toxicological studies. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 1078-1085, 2010.

WHO. 1994a. Brominated diphenyl ethers. International programme on chemical safety. Environmental Health Criteria 162. World Health Organization. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc162.htm> (acessado 06/2016).

WILFORD, B. H.; SHOEIB, M.; HARNER, T.; ZHU, J.; JONES, K. C. Polybrominated diphenyl ethers in indoor dust in Ottawa, Canada: implications for sources and exposure. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 7027-7035, 2005.

WU, J.; DANG, Y.; SU, W.; LIU, C.; MA, H.; SHAN, Y.; PEI, Y.; WAN, B.; GUO, J.; YU, L. Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B—Two novel markers of autophagosome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 339, p. 437–442, 2006.

YEN, J. H.; LIAO, W. C.; CHEN, W. C. WANG, Y. S. Interaction of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) with anaerobic mixed bacterial cultures isolated from river sediment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 165, p. 518-524, 2009.

YU, G.; BU, Q.; CAO, Z.; DU, X.; XIA, J.; WU, M.; HUANG, J. Brominated flame retardants (BFRs): A review on environmental contamination in China. **Chemosphere**, v. 150, p. 479-490, 2016.

YU, R.; ZHANG, Z. Q.; WANG, B.; JIANG, H. X.; SHEN, L. M. Berberine-induced apoptotic and autophagic death of HepG2 cells AMPK activation. **Cancer Cell International**, 2014.

YUAN, S.; AKEY, C. W. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. **Structure**, v. 21, p. 501-51, 2013.

ZHANG, C.; LIU, X.; CHEN, D. Role of brominated diphenyl ether-209 in the differentiation of neural stem cells in vitro. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 28, p. 497-502, 2010.

ZHANG, M.; BUEKENS; A.; Li, X. Brominated flame retardants and the formation of dioxins and furans in fires and combustion. **Journal of Hazardous Materials**, v. 304, p. 26-39, 2016.

ZHANG, S.; HORROCKS, A. R. A review of flame retardant polypropylene fibres. **Progress in Polymer Science**, v. 28, p. 1517-1538, 2003.

ZHANG, Z.; OHIOZEBAU, E.; RHIND, S. M. Simultaneous extraction and clean-up of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls from sheep liver tissue by selective pressurized liquid extraction and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 1203-1209, 2011.

ZHAO, G. F.; ZHOU, H.; LIU, X.; ZHANG, P.; WEN, W.; YU, Y. PHAHs in 14 principal river sediments from Hai River basin, China. **Science Total Environment**, v. 427–428, p. 139–145, 2012.

ZHAO, et al. Polybrominated diphenyl ethers in sediments of the Daliao River Estuary, China: Levels, distribution and their influencing factors. **Chemosphere**, **82**, p. 1262–1267, 2011.

ZHIVOTOVSKY, B.; SAMALI, A.; GAHM, A.; ORRENIUS, S. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 6, p. 644–651, 1999.

ZHOU, P. LIN, K.; ZHOU, X.; ZHANG, W.; HUANG, K.; LIU, L.; GOU, J.; XU, F. Distribution of polybrominated diphenyl ethers in the surface sediments of the Taihu Lake, China. **Chemosphere**, v. 88, p. 1375–1382, 2012.

ZHOU, T.; TAYLOR, M. M.; DEVITO, M. J.; CROFTON, K. M. Developmental exposure to brominated diphenyl ethers results in thyroid hormone disruption. **Toxicology Sciences**, v. 66, p. 105–116, 2002.

ZHU, L.Y.; HITES, R.A. Brominated flame retardants in sediment cores from lakes Michigan and Erie. **Environmental Science Technology**, v. 39, p. 3488–3494, 2005.