



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de múltiplos parâmetros em zebrafish (*Danio rerio*) para a toxicidade de retardantes de chama: alterações no desenvolvimento e alterações neurocomportamentais

RENAN VIEIRA MARINO

**Ribeirão Preto
2022**

RENAN VIERA MARINO

**Avaliação de múltiplos parâmetros em zebrafish (*Danio rerio*)
para a toxicidade de retardantes de chama: alterações no
desenvolvimento e alterações neurocomportamentais**

Versão corrigida da
Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia no dia 01/04/2022. A
versão original encontra-se disponível
na Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão
Preto/USP.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle
Palma de Oliveira

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 01/04/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto
2022

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.

Marino, Renan Vieira

Avaliação de múltiplos parâmetros em zebrafish (*Danio rerio*) para a toxicidade de retardantes de chama: alterações no desenvolvimento e alterações neurocomportamentais. Ribeirão Preto, 2022.

76 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Oliveira, Danielle Palma.

1. Retardantes de chama.
2. Avaliação de Toxicidade.
3. Zebrafish.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Renan Vieira Marino

Título do trabalho: Avaliação de múltiplos parâmetros em zebrafish (*Danio rerio*) para a toxicidade de retardantes de chama: alterações no desenvolvimento e alterações neurocomportamentais

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Renan Vieira Marino

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Agradeço à minha orientadora, Professora Dra. Danielle Palma de Oliveira, por toda confiança, paciência e suporte, por me conceder a oportunidade e me guiar durante todo o período decorrido no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, por toda estrutura, organização e competência desta instituição de excelência, transformando não só profissionais, mas pessoas melhores.

Ao laboratório EcoHumanTox, a todo acolhimento e crescimento que me foi proporcionado, em especial para Dra. Flávia e Taísa por toda paciência e suporte prestados por vocês. Agradeço aos técnicos, Klaus e Sônia, pela competência e companheirismos, e a todos colegas que fizeram parte desta jornada: Andréia, Tamires, Thais, Lucas e Camila.

Ao Professor Dr. Daniel Junqueira Dorta e seus alunos pela colaboração e disponibilidade de uso do laboratório para os trabalhos realizados, também ao professor Dr. Carlos Gravato da Universidade de Lisboa pelos ensinamentos e recomendações.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - código de financiamento: 88882.369829/2019-00) pelo incentivo financeiro que possibilitou a realização deste trabalho, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo: 2018/2429-2).

Agradeço à minha família, mãe, pai e irmãs, pela compreensão, suporte, e acolhimento nos tempos difíceis, pela união e saúde de todos nós.

Agradeço a meus amigos, Vitor, Martin, Caio, Victor e Renan, pelo companheirismo de tantos anos e por compartilhar meus momentos com estas pessoas incríveis. Também agradeço a Luísa e Zé, por dividirem comigo o lar que me acolheu durante esta etapa tão importante.

RESUMO

MARINO, R. V. **Avaliação de múltiplos parâmetros em zebrafish (*Danio rerio*) para a toxicidade de retardantes de chama: alterações no desenvolvimento e alterações neurocomportamentais.** 2022. 76f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Os retardantes de chama são compostos que envolvem um grupo diversificado de produtos químicos adicionados a materiais manufaturados, como plásticos, acabamentos de revestimento e têxteis. Estes compostos previnem que incêndios se alastrem rapidamente, salvando vidas e diminuindo os danos causados. A falta de regulamentação em muitos países abre espaço para que retardantes como os Éteres difenílicos bromados (BDEs), sejam utilizados. Os BDEs revelaram várias preocupações relacionadas à sua persistência e toxicidade, resultando em uma necessidade crescente de substituição devido a seus mecanismos tóxicos tanto para humanos, quando para o ambiente. O uso de retardantes de chama livres de halogênio (HFFR) aumentou como uma alternativa mais segura, porém poucas informações estão disponíveis sobre o potencial tóxico da classe. Neste estudo, o retardante de chamas alternativo dietil fosfinato de alumínio (ALPI) foi analisado e comparado diretamente com um dos congêneres dos BDEs, o BDE-47, conhecido por sua alta toxicidade e potencial bioacumulativo. Os ensaios conduzidos buscaram comparar e avaliar diversos parâmetros entre estes dois retardantes, utilizando peixe-zebra (*Danio rerio*) em sua fase inicial de desenvolvimento, como organismo modelo e método alternativo ao uso de animais adultos. Ensaio de toxicidade aguda até 96hpf (horas pós fertilização) demonstraram efeitos sub-letalidade para para o BDE-47 e, em contrapartida, não foram observados efeitos para o ALPI. Para os ensaios comportamentais e neurotóxicos foi realizado um teste de movimentação espontânea embrionária e avaliação da atividade da acetilcolinesterase (AChE), respectivamente. Tanto ALPI quanto BDE-47 não apresentaram variações significativas. Por fim, foi realizado a avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo, com objetivo de identificar efeitos precoces. Foram analisados as atividades das enzimas glutathione s-transferase (GST) e catalase (CAT) e também a peroxidação lipídica (LPO). Foi observado que ambos retardantes aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio, devido a um aumento na atividade da CAT, porém, nas concentrações testadas, não houve aumento da peroxidação lipídica, sendo o sistema antioxidante do organismo suficiente para impedir danos celulares. Este estudo pode concluir que o ALPI se mantém como um bom candidato à substituição de retardantes de chama mais tóxicos.

Palavras-chave: Retardantes de chama, dietil fosfinato de alumínio, éteres difenílicos bromados, zebrafish, avaliação toxicológica.

ABSTRACT

MARINO, R. V. **Evaluation of multiple parameter in zebrafish (*danio rerio*) for the assessment of the toxicity of flame retardants: developmental changes, oxidative stress induction and neurobehavioral changes** 2022. 76f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Flame retardants subsumes a diverse group of chemicals which are added to manufactured materials, such as plastics, surface finishes and textiles. These compounds prevent fires from spreading quickly, saving lives and reducing damage. The lack of regularity in many countries makes room for retardants such as brominated diphenyl ethers (BDEs) to be used. The BDEs reveal several concerns related to their persistence and toxicity, resulting in an increasing need for substitution due to their toxic mechanisms for both humans and environment. The use of halogen-free flame retardants (HFFR) has increased as a safer alternative, but little information is available about the toxic potential of this chemicals. In this study, the alternative flame retardant aluminum diethyl phosphinate (ALPI) was analyzed and compared directly with one of the BDE congeners, BDE-47, known for its high toxicity and bioaccumulative potential. The tests carried out sought to compare and evaluate several parameters between these two retardants, using zebrafish (*Danio rerio*) in their initial stage of development, as a model organism and an alternative method to the use of animals. Acute toxicity assays at 96hpf (hours post fertilization) showed significant sub-lethal effects for samples exposed to BDE-47, nothing was observed for ALPI. For behavioral and neurotoxic assays, a spontaneous embryo movement test and evaluation of acetylcholinesterase (AChE) activity were performed. Both ALPI and BDE-47 did not show significant variations. Finally, the evaluation of biomarkers of oxidative stress was carried out, in order to identify early effects. The activities of glutathione s-transferase (GST) and catalase (CAT) enzymes and also lipid peroxidation (LPO) were analyzed. It was observed that both retardants increase the production of reactive oxygen species, due to an increase in CAT activity, however, at the concentrations tested, there was no significant effect on lipid peroxidation, due to the body's antioxidant system being sufficient to prevent cell damage. This study can conclude that ALPI remains a good candidate to replace other toxic flame retardants.

Keywords: Flame retardants, aluminum diethyl phosphinate, brominated diphenyl ethers, zebrafish, toxicological evaluation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural geral dos PBDEs.....	5
Figura 2: Estrutura química do ALPI.....	8
Figura 3: Reação de transformação do radical superóxido em água e oxigênio realizado pelas enzimas superóxido dismutase e catalase.....	14
Figura 4: Embrião de <i>zebrafish</i> em estágio de blástula, com 2,5 horas pós-fertilização.....	18
Figura 5: Esquema do ensaio para avaliação da toxicidade aguda (FET test).....	21
Figura 6: Esquema geral das etapas para ensaio de biomarcadores em peixe-zebra.....	22
Figura 7: Organização da microplaca para a quantificação de proteína S9 em larvas de peixe-zebra expostas às diferentes concentrações de retardantes de chama.....	26
Figura 8: Reação TBARS para quantificação de peroxidação lipídica.....	27
Figura 9: Organização da microplaca para peroxidação lipídica em larvas de peixe-zebra expostas às diferentes concentrações de retardantes de chama.....	28
Figura 10: Organização da microplaca para atividade da catalase em larvas de peixe-zebra expostas às diferentes concentrações de retardantes de chama.....	29
Figura 11: Teste de Ellman para determinação da atividade da acetilcolinesterase.....	31
Figura 12: Frequência cumulativa de embriões / larvas de peixe-zebra (24-96 h pós-fertilização) após exposição a dietilfosfinato de alumínio (ALPI) e após exposição para congêneres de difenil éter polibromado BDE-47 com edemas de pericárdio e saco vitelino.....	35
Figura 13: Efeitos do BDE-47 em embriões / larvas de peixe-zebra em 48h pós-fertilização (hpf).....	36
Figura 14: Resultados apresentados para Burst Activity (%); Burst count/minute e Burst duration (s).....	39
Figura 15: Resultados apresentados para atividade de acetilcolinesterase.....	42
Figura 16: Resultados apresentados para atividade da GST.....	44
Figura 17: Resultados apresentados para atividade da CAT e LPO.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: *Endpoints* avaliados em cada período de desenvolvimento do estágio embrio-larval de *zebrafish* (Adaptado de NAGEL, 2002).....34

Tabela 2: Frequência de ocorrência de edemas (%) nos primeiros estágios de vida do peixe-zebra exposto a Difenil Éteres Polibromados (PBDEs) e dietilfosfinato de alumínio (ALPI). Os edemas localizavam-se no pericárdio e / ou saco vitelínico (n = 60). Edemas foram contados quando observados pela primeira vez, e então não foi recontado até o final do teste, para evitar a contagem do mesmo organismo mais de uma vez. Em organismos com dois tipos de edema (pericárdio e saco vitelino), apenas um foi considerado.....35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PBDEs/BDEs	Eteres de difenila polibromados
BDE-47	2,2',4,4'-Éter de difenila tetrabromado
ALPI	Dietil fosfinato de alumínio
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
DMSO	Dimetilsulfóxido
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FET	Fish embryo acute toxicity test
hpf	Horas pós fertilização
LPO	Peroxidação lipídica
GST	Glutathione S-transferase
GSH	L-Glutathione reduzida
CAT	Catalase
AChE	Acetilcolinesterase
MDA	Malonaldeído
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
DCA	3,4-dicloroanilina
SOD	Superóxido dismutase
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
HSP	Heat Shock Proteins

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista De Figuras.....	iii
Lista De Tabelas.....	iv
Lista De Abreviaturas E Siglas.....	v
1. Introdução.....	1
1.1 Contaminantes de Preocupação Emergente.....	1
1.2 Retardantes De Chama.....	2
1.2.1 Retardantes De Chama Bromados (BFRs).....	3
1.2.2 Retardantes De Chama Livres De Halogênio (HFFRs).....	6
1.3 Peixe-Zebra (<i>Danio Rerio</i>).....	9
1.4 Parâmetros Utilizados.....	11
1.4.1 Teste De Toxicidade Aguda (FET).....	11
1.4.2 Avaliação Neurocomportamental Do Desenvolvimento.....	11
1.4.3 Avaliação De Neurotoxicidade.....	12
1.4.4 Biomarcadores De Estresse Oxidativo (ROS).....	13
2. Objetivo.....	16
3. Materiais E Métodos.....	17
3.1 Agentes Químicos Testados E Soluções Estoque.....	17
3.2 Manutenção Do Peixe-Zebra E Coleta Dos Embriões.....	18

3.3	Teste De Toxicidade Aguda.....	19
3.4	Ensaio De Movimentação Espontânea (“ <i>Tail Coiling</i> ”).....	21
3.5.1	<i>Exposição Dos Embriões E Congelamento</i>	24
3.5.2	<i>Homogenização Das Amostras</i>	24
3.5.3	<i>Quantificação De Proteína S9</i>	25
3.5.4	<i>Peroxidação Lipídica (LPO)</i>	26
3.5.5	<i>Catalase (CAT)</i>	28
3.5.6	<i>Glutathione S-Transferase (GST)</i>	29
3.5.7	<i>Atividade Da Acetilcolinesterase (AChE)</i>	30
3.6	Análise Estatística.....	31
4.	Resultados E Discussão.....	33
4.1	Teste De Toxicidade Aguda (FET Test).....	33
4.2	Análises De Neurocomportamentais E De Neurotoxicidade.....	37
4.2.1	<i>Ensaio De Enrolamento Da Cauda (“Tail Coiling Assay”)</i>	37
4.2.2	<i>Atividade Da Acetilcolinesterase</i>	41
4.3	Biomarcadores De Estresse Oxidativo.....	43
5.	Conclusão.....	50
6.	Sugestões para trabalhos futuros.....	51
7.	Bibliografia.....	52

1. Introdução

1. Introdução

1.1 Contaminantes de preocupação emergentes

Nas últimas décadas, houve o vertiginoso desenvolvimento da indústria, transporte, agricultura e urbanização, melhorando sem dúvida, os padrões de vida da sociedade, porém à custa de elevada demanda de consumo, que trouxe consequências para a qualidade ambiental. Dentre os impactos decorrentes da vida moderna, destacamos a contaminação/poluição do ar, água e solo, devido ao descarte inadequado de resíduos, assim como a utilização de bens descartáveis ou materiais não biodegradáveis, além da utilização exagerada de recursos naturais (GAVRILESCU et al., 2015).

Entre os poluentes ambientais, um grupo de substâncias é classificado como contaminantes emergentes, mais recentemente denominados de “contaminantes de preocupação emergente”. A Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) define "contaminante de preocupação emergente" como um produto químico ou material caracterizado por uma ameaça percebida, potencial ou real à saúde humana ou ao meio ambiente (US EPA, 2019). A emissão dos chamados contaminantes emergentes começou como um problema ambiental e existe um senso comum em que este tipo de contaminação requer uma intervenção legislativa. Para Petrovic & Barceló o termo “contaminantes emergentes” não significa necessariamente novas substâncias (isto é, introduzidas recentemente), mas também pode incluir compostos com efeitos adversos previamente não reconhecidos nos ecossistemas. Assim sendo, “contaminantes emergentes” ou “contaminantes de preocupação emergente” podem ser definidos como contaminantes que não estão inclusos na rotina dos programas regulatórios e que devem ser candidatos para futura regulamentação. Para tanto, se faz necessária a pesquisa ecotoxicológica (BARCELÓ et al., 2008).

Os contaminantes emergentes podem se bioacumular e/ou persistir no meio ambiente. A exposição a longo prazo a poluentes emergentes ou a absorção de quantidades vestigiais destes compostos por meio de contato dérmico, inalação ou ingestão pode causar efeitos adversos à saúde em diferentes organismos não alvo em concentrações tão baixas quanto alguns nanogramas por litro. Além disso,

efeitos aditivos ou sinérgicos são possíveis. Adicionalmente, a persistência os permite se difundirem no ambiente e alcançarem todos os compartimentos ambientais, se movendo de suas áreas de produção/liberação até áreas rurais e remotas, elevando a contaminação pontual para uma escala regional e global de poluição (BALDUCCI et al., 2012). No entanto, a falta de dados toxicológicos, principalmente relacionados à efeitos nocivos para a saúde humana e os danos potenciais ao meio ambiente também são uma preocupação relacionada a esses compostos.

Neste trabalho estudos dos representantes de substâncias conhecidas como retardantes de chama foram conduzidos. Considerados como contaminantes de preocupação emergente, estes compostos sempre estão em pauta em questões ambientais e de saúde humana.

1.2 Retardantes de Chama

Em 2020, os bombeiros locais responderam a cerca de 1,4 milhões de incêndios nos Estados Unidos. Esses incêndios causaram 3.500 mortes civis e 15.200 feridos. Os danos a propriedades foram estimado em US\$21,9 bilhões (AHRENS; EVARTS, 2021). A incidência de incendios caiu em parte por conta de políticas de prevenção que exigem a presença de produtos químicos, os retardantes de chama, presentes em muitos produtos industriais, como materiais construtivos, mobílias e equipamentos eletroeletrônicos. Portanto, não só os retardantes de chama salvam vidas e previnem danos, mas também reduzem o custo econômico de incêndios. Além de seu impacto prejudicial imediato, os incêndios também podem gerar contaminantes ambientais, como dibenzo-p-dioxinas poli-halogenadas e poli-halogenadas dibenzo-p furanos, que são conhecidos por terem o potencial para afetar negativamente os seres humanos e o meio ambiente (BIRNBAUM et al., 2003; BIRNBAUM; STAKAL, 2004).

O tamanho do mercado global de retardantes de chama foi avaliado em US\$7,46 bilhões em 2020 e deve crescer a uma taxa de de 8% anualmente entre o período de 2021 a 2028. O segmento de eletro eletrônicos domina o mercado, com

uma parcela de 38,15%. Com a o crescimento deste mercado, diversas classes e novas moléculas são produzidas, entre as classes estão os halogenados orgânicos (bromados e clorados), compostos de fósforo, nitrogênio, inorgânicos e os novos livres de halogênio (BIRNBAUM; STAKAL, 2004; BOTARO; TORRES, 2007; GRAND VIEW RESEARCH, 2021).

Países como Estados Unidos possuem um grande mercado para os retardantes, além de legislações e órgãos reguladores que garantem a aplicação destes produtos em diversos setores industriais. Apesar da grande importância que os retardantes de chama desempenham, tanto para salvar vidas, quanto economicamente, outros países, como o Brasil, ainda não possuem uma legislação específica que garante a utilização dos retardantes de chama, apenas normas técnicas da ABNT, como a NBR 16405:2015 que avalia ignitabilidade em assentos estofados. Muitas destas normas surgiram principalmente depois do desastre ocorrido em 2013 na boate Kiss, na cidade de Santa Maria – RS. Apesar de pouco empregado, o mercado e a indústria de retardantes de chama vem crescendo no Brasil. Organizações como ABICHAMA (Associação Brasileira da indústria dos retardantes de chama) procuram conscientizar e informar, promovendo discussões acerca do assunto e inclusive salientando os impactos ambientais que alguns destes compostos podem causar (SANTOMAURO, 2016).

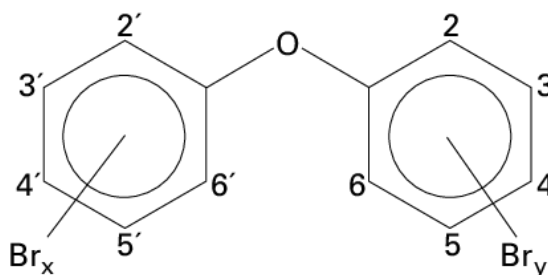
1.2.1 Retardantes de Chama Bromados (BFRs)

Uma das classes mais utilizadas de retardantes são os bromados, conhecidos por BFRs (do inglês brominated flame retardants), uma classe de compostos usada para retardar a propagação das chamas em residências e estabelecimentos comerciais, sendo utilizado em tecidos de uso interno, espuma e produtos eletrônicos (ALAE et al., 2003). A maioria dos BFRs são "aditivos" e são, portanto, misturados diretamente a materiais, sem ocorrer reação entre eles durante a produção. Com isso são facilmente emitidos para o meio ambiente durante fabricação, uso e descarte (EUR, 2001). Devido a sua alta lipofilicidade e estabilidade química, podem ser encontrados em diversos compartimentos

ambientais e em fluidos biológicos humanos, tais como tecido adiposo, leite materno e sangue humano; além de peixes, pássaros, animais marinhos, sedimentos, alimentos, poeira doméstica e no ar presente dentro e fora de domicílios (PESTANA et al., 2008). Como resultado, os BFRs foram observados em matrizes ambientais em muitas partes do mundo, incluindo o Ártico, onde nunca foram produzidos e usados, demonstrando sua persistência, capacidade de bioacumulação e transporte (WIT, 2002).

Os difenil éteres polibromados (PBDEs) são os retardantes mais empregados dentro da classe dos bromados, muito utilizados em alguns países da América do Sul, África e Ásia, devido ao seu menor custo e maior eficiência quando comparados a outros retardantes (BOTARO; TORRES, 2007; PESTANA et al., 2008). Devido a preocupações relacionadas à persistência, biodisponibilidade e toxicidade de BDEs, em 2004, penta e octa BDEs foram banidos na Europa e descontinuados nos E.U.A, em 2009, foram incluídos como poluentes orgânicos persistentes na Convenção de Estocolmo (BETTS, 2007; UNEP, 2009).

Esta classe de compostos químicos é formada por dois anéis benzênicos ligados por um átomo de oxigênio. A estes anéis podem estar ligados de 1 a 10 átomos de bromo. Sua fórmula molecular, $C_{12}H_{(10-n)}O_{(n)}$ sendo $1 \leq n \leq 10$ (Figura 1). Cada congêneres de PBDE varia pelo número de átomos de bromo e pela disposição destes átomos, sendo possível, em teoria, a existência de 209 congêneres (EPA 2006). Existem três produtos comercializados: (i) pentabromodifenil éter (pentaBDE), (ii) octabromodifenil éter (octaBDE), e (iii) decabromodifenil éter (decaBDE). Cada um destes produtos é formado por uma mistura de congêneres, sendo o decaBDE o composto mais produzido no mundo (ALAE et al., 2003; EPA, 2006). A grande maioria dos PBDEs apresenta baixa pressão de vapor, alta estabilidade e lipossolubilidade, responsáveis pelo alto potencial de bioacumulação (DIETZ et al., 2007).

Figura 1: Fórmula estrutural geral dos PBDEs

Fonte: DARNERUD et al. (Environmental health perspectives 109 49-68, 2001)

A absorção dos PBDEs se dá principalmente por inalação, na maioria partículas emitidas na fase gasosa, principalmente durante o aquecimento (ou queima) do produto em que está impregnado (HELLSTRÖM, 2000). Um estudo realizado entre 2002 e 2003 com 157 mulheres australianas investigou a presença de PBDEs no leite materno. Em todas as amostras estudadas foram encontrados diferentes congêneres, principalmente BDEs-47 e -99, um estudo similar, realizado com 47 mulheres, verificou também, níveis elevados de todos os congêneres estudados (SCHECTER et al., 2003; TOMS et al., 2007).

Segundo Hooper e MacDonald, (2000), o decaBDE é pouco absorvido, rapidamente eliminado, não bioacumulativo e pouco bioativo. Em contrapartida, devido ao menor peso molecular dos outros congêneres, o tri-, tetra-, penta- e hexaBDEs são completamente absorvidos, lentamente eliminados, altamente bioacumulativos e muito mais bioativos que o deca-BDE. A toxicidade dos BDEs aumenta quanto menos átomos de bromo ligados aos anéis. Recentes, estudos demonstraram que certos PBDEs se convertem em outros congêneres. Quando exposto à luz solar, o decaBDE sofre conversão em outros congêneres de menor peso molecular que são bioacumulativos. Além disso, podem se converter em formas hidroxiladas que originalmente não são incluídas nas misturas comerciais (HOOPER; MCDONALD, 2000; WATANABE; TATSUKAWA, 1987).

Um estudo recente quantificou a presença de diferentes congêneres de BDEs no rio Elemi (Nigéria) em um período de 6 meses. Foi observado a presença principalmente do BDE-28 (tri bromado) e BDE-47 (tetra bromado) em uma

concentração ambiental média de 0.0047 μ g/L, demonstrando a alta capacidade de bioacumulação dos congêneres com menor peso molecular (IBIGBAMI, 2021).

Além disso, existem evidências dos PBDEs causarem alterações comportamentais e motoras em macacos, desregulação do sistema endócrino, principalmente de hormônios reprodutivos, além de efeitos neurotóxicos envolvendo o peixe-zebra e outros organismos aquáticos, comprovando também sua capacidade de biomagnificação na cadeia trófica (CHOU et al., 2010; CHEN et al. 2012; DÍAZ-JARAMILLO et al., 2016; ERIKSSON et al., 2006; HAN et al. 2011).

Ao passo que conhecemos os efeitos negativos apresentados pelos BDEs, tanto para saúde humana quanto seu impacto ambiental, sua utilização ainda existe em diversas regiões do mundo, devido a falta de regulamentação dos órgãos locais. Isso leva a persistência em compartimentos ambientais, principalmente por conta de sua degradação que gera congêneres mais persistentes (PESTANA et al., 2008).

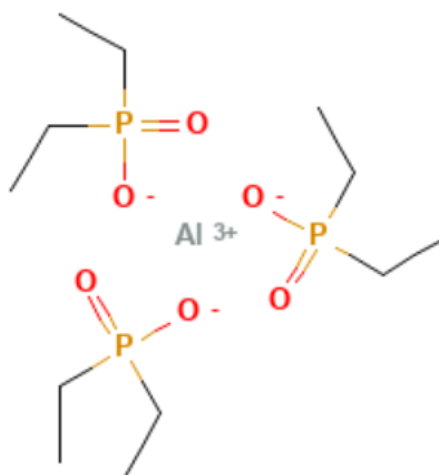
Apesar da diversidade estrutural dos PBDEs ser uma das barreiras para esclarecer sua toxicidade, uma vez que seus mecanismos tóxicos podem ser influenciados pelas diferenças estruturais de cada congêneres, ano após ano, novos estudos relatam diferentes efeitos tóxicos desencadeados pelos BDEs, portanto há uma necessidade urgente de sua substituição por retardantes de chama mais adequados e menos tóxicos. Por isso, novas estruturas foram propostas como agentes alternativos e substitutos aos PBDEs, com destaque para os retardantes de chama não halogenados.

1.2.2 Retardantes de Chama Livres de Halogênio (HFFRs)

Vários fabricantes já substituíram voluntariamente os BDEs por retardantes de chama alternativos. Portanto, o uso de HFFRs como retardantes de chama de ésteres organofosforados tem aumentado como uma alternativa aos BRFs, não sendo persistente ou bioacumulativo e rapidamente biodegradado no meio ambiente. Muitos desses HFFRs já estão sendo comercializados, embora haja um conhecimento limitado sobre seu impacto potencial no ambiente (BETTS, 2007; VAN DER VEEN; DE BOER, 2012).

HFFRs podem ser divididos em várias categorias, sendo as mais importantes: retardantes de chama inorgânicos e sinergistas (usados principalmente para equipamentos eletrônicos), compostos organofosforados e seus sais (invólucros de produtos de consumo), retardantes de chama orgânicos à base de nitrogênio (eletrônicos) e sistemas intumescentes (revestimentos têxteis). Dentre os possíveis substitutos está o dietil fosfinato de alumínio (ALPI). Em estudo realizado por Waaijers et al. (2013) utilizando *Daphnia magna* como modelo experimental, esse composto foi classificado dentre os melhores substitutos para o retardantes de chama bromados (WAAIJERS et al., 2013a).

O ALPI (CAS# 225789-38-8), pertencente à família dos sais de ácido alquil fosfínicos (Figura 2), é utilizado em epóxis e polímeros como retardante de chama, principalmente em produtos eletroeletrônicos. Esse composto apresenta moderada solubilidade em água e nenhuma a solventes orgânicos, encontrando-se na forma sólida em temperatura ambiente. Sua persistência no ambiente foi relatada como moderada a alta; porém, há ainda poucos estudos sobre esse assunto. Além disso, os estudos disponíveis também demonstram que o ALPI tem baixa ecotoxicidade e capacidade de bioacumulação; baixa capacidade de induzir mutagenicidade em ensaios com *Salmonella*; baixa toxicidade para os roedores, afetando, entretanto, o neurodesenvolvimento e a plasticidade sináptica em camundongos. Desta forma, há controvérsias e falta de informações acerca dos potenciais efeitos tóxicos decorrentes da exposição a este composto, tornando necessária a pesquisa por mais dados sobre sua toxicidade (WAAIJERS et al., 2013b; WAAIJERS et al., 2013c).

Figura 2: Estrutura química do ALPI

Fonte: PubChem database, 2022

Um estudo realizado por Hendriks et al. (2013) testou a citotoxicidade e neurotoxicidade *in vitro* comparando diferentes HFFRs e BDEs. Entre os parâmetros utilizados foi testada a viabilidade celular, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e Imagem fluorescente de célula única [Ca²⁺]. O teste demonstrou que o ALPI possui uma potência neurotóxica desprezível, enquanto para o BDE-209, congênera menos tóxica da classe, apresentou baixa potência neurotóxica (HENDRIKS et al., 2014).

Ainda não existem dados relatando a presença em compartimentos ambientais ou em tecidos humanos do ALPI. A falta de informação sobre os HFFRs torna seu estudo de extrema importância, assim será possível discorrer sobre seu impacto, além proporcionar uma avaliação mais adequada sobre o benefício da substituição de outros retardantes presentes no mercado.

1.3 Peixe-Zebra (*Danio rerio*)

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um pequeno peixe tropical de água doce nativo dos rios da Índia e do Sul da Ásia. Os estágios de desenvolvimento embrionário foram descritos por Kimmel em 1995, elucidando como o zebrafish poderia ser utilizado como organismo modelo para diversos testes e desde então ele tem sido cada vez mais adotado pela comunidade científica (KIMMEL et al., 1995).

O peixe-zebra (*Danio rerio*) oferece uma série de vantagens práticas como organismo modelo, tornando esses vertebrados altamente interessante em pesquisas toxicologicamente relevantes. O peixe-zebra pode ser empregado como um poderoso sistema de modelo *in vivo* para avaliar as interações biológicas e é uma plataforma excelente para detalhar os mecanismos pelos quais as substâncias induzem respostas biológicas específicas. Uma semelhança notável na estrutura celular, processos de sinalização, anatomia e fisiologia existe entre o peixe-zebra e outros vertebrados de alta ordem, particularmente no início do desenvolvimento (TRUONG et al., 2011). Estima-se que mais de 90% dos quadros de leitura em humanos são homólogos a genes em peixes (KIMMEL et al., 1995). Assim, as investigações usando este sistema de modelo podem revelar interações sutis que provavelmente serão conservadas entre as espécies.

As características da biologia do peixe-zebra são favoráveis para adaptar este sistema modelo a ensaios de alto rendimento (*high-throughput screening*). As fêmeas do peixe-zebra são capazes de produzir centenas de ovos por semana, portanto, grandes quantidades de organismos são facilmente obtidos, permitindo estudos de dose-resposta estatisticamente poderosos. Essa oferta abundante de embriões também permite avaliar simultaneamente a toxicidade de um grande número de substâncias em um curto período de tempo.

Dentro deste contexto, os testes de toxicidade aguda com a espécie de peixe zebrafish (*Danio rerio*) são realizados na sua fase inicial de vida, selecionados como indicadores de contaminação aquática de diferentes níveis tróficos (TRUONG et al., 2011). Assim como outras espécies de peixe, o zebrafish apresenta os estágios de desenvolvimento larval, juvenil e adulto. A eclosão do embrião ocorre

em 72-96 horas pós-fertilização (hpf), e o estágio larval inicia-se após 120 hpf com o início da alimentação exógena, atingindo a maturidade em apenas 3 meses. Outra grande vantagem é que os embriões de peixe-zebra se desenvolvem externamente ao corpo da mãe e são opticamente transparentes, então é possível observar o desenvolvimento de estruturas internas individualmente *in vivo* durante a duração de uma exposição usando técnicas microscópicas simples, e vários efeitos podem ser avaliados de forma não invasiva ao longo do desenvolvimento.

Embriões de peixe-zebra podem ser expostos individualmente em placas de cultura celular com múltiplos poços, de forma que o volume necessário para o modelo seja pequeno; assim, apenas quantidades limitadas de materiais são necessárias para avaliar todo um conjunto de interações e respostas biológicas. Os primeiros estágios de desenvolvimento da vida são frequentemente sensíveis à agentes químicos, em parte devido às enormes mudanças na diferenciação, proliferação e migração celular necessárias para formar vários tipos de células, tecidos e órgãos (MODY; VEGF, 2003; RASOOLY, et al., 2003). Como o desenvolvimento é altamente coordenado, exigindo comunicações específicas de célula a célula, se a exposição a uma substância durante esse período crítico perturbar essas interações, o desenvolvimento será interrompido ou prejudicado. O desenvolvimento alterado pode se manifestar como malformações morfológicas, anormalidades comportamentais, alterações de biomarcadores ou morte de embriões (OECD 2013; SAINT-AMANT; DRAPEAU 1998; VAN DER OOST et al., 2016).

Nos últimos anos, testes iniciais em estágio de vida com embriões de peixe-zebra foram sugeridos como um dos testes alternativos animais mais promissores e viáveis em toxicologia geral, em especial na área ambiental e presente nas diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) para análise dos efeitos de compostos químicos sobre sistemas bióticos (OECD teste nº 236). Adicionalmente, este ensaio tem sido sugerido como substituto ou como refinamento do teste de peixe adulto, por razões éticas, considerando que os embriões de peixe até a fase de alimentação independente não possuem sistema nervoso maduro e, portanto, não sentem dor ou sofrimento durante os testes. Assim,

não são protegidos pela Diretriz 86/609/EEC, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos com base no princípio dos 3Rs (Redução, Substituição, Refinamento) (BRAUNBECK; LAMMER, 2006; OECD 2013).

1.4 Parâmetros utilizados

1.4.1 Teste de toxicidade aguda (FET)

Conhecido como *Fish Embryo Acute Toxicity* (FET), este teste avalia as possíveis alterações no desenvolvimento dos estágios embrio-larvais do zebrafish. Este teste está descrito e padronizado na guideline da OECD (nº 236) e tem como objetivo avaliar a toxicidade aguda decorrente da exposição aos compostos a partir de observações visuais de malformações embrionárias. O FET é um dos métodos alternativos ao uso de animais mais promissores em toxicologia geral. A partir dele pode se ter uma noção dos possíveis efeitos esperados para cada composto nos testes subsequentes, assim, é utilizado como teste preliminar para análises toxicológicas em zebrafish (OECD 2013).

1.4.2 Avaliação Neurocomportamental do Desenvolvimento

É bem sabido que o sistema nervoso em desenvolvimento apresenta maior sensibilidade a alguma exposição química quando comparada ao sistema nervoso adulto. Este fato ocorre porque o desenvolvimento normal do sistema nervoso geralmente requer espaço, tempo e coordenação de eventos críticos, como proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, mielinização e apoptose, que podem ser prejudicados por substâncias tóxicas. (BARONE et al., 2000). Consistente com esta ideia, Selderslaghs et al. sugeriram um novo método alternativo para testes neurocomportamentais com base na movimentação da cauda em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*) ainda em suas primeiras horas de desenvolvimento, demonstrando mais tarde que a maioria dos compostos neurotóxicos conhecidos como o clorpirifós, um inseticida organofosforado, resultou em hipo ou hiperatividade em embriões expostos (SELDERSLAGHS et al., 2010).

O enrolamento espontâneo da cauda no peixe-zebra envolve contrações laterais do tronco e consiste no primeiro comportamento motor dos embriões. Começa a 17 hpf, atingindo um pico em 19 hpf e, em seguida, há uma alteração nos padrões de movimentação, resultando em uma atividade motora diferente, conhecida como “resposta induzida pelo toque” por 26 hpf (SAINT-AMANT; DRAPEAU 1998). A partir de 28 hpf a atividade motora dos embriões diminui gradualmente, tornando o teste inviável. Assim, deve-se esperar que a análise da atividade de enrolamento da cauda deve ser realizada em um período de desenvolvimento onde mínimas variações nos padrões de atividade são observadas, a fim de evitar interpretações errôneas dos resultados.

Durante a última década, contribuições valiosas foram adicionadas ao ensaio de enrolamento da cauda (“*tail coiling*”). O potencial da atividade de enrolamento para discriminar modos de ação para compostos que interferem com neurotransmissão foi investigado inicialmente por Vliet et al.(2007); Ogungbemi et al.(2020) relatam parâmetros experimentais importantes otimizados, como, condições de criação, exposição, aclimatação e duração da análise e que não há influência entre a atividade embrionária adjacente, permitindo-lhes analisar um grupo de embriões simultaneamente. Recentemente, nosso grupo de pesquisa publicou um estudo que padronizou parâmetros como controles positivos viáveis ao teste e solventes não tóxicos que podem ser utilizados sem que influencie a atividade dos embriões (OGUNGBEMI et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2021; VLIET et al., 2017).

1.4.3 Avaliação de Neurotoxicidade

Outro parâmetro analisado foi a atividade da enzima colinesterase, que é um indicador de efeito neurotóxico amplamente utilizado, inclusive em estudos com peixe-zebra. A acetilcolinesterase AChE está envolvida na desativação da acetilcolina nas terminações nervosas, evitando disparos nervosos contínuos, o que é vital para o funcionamento normal dos sistemas sensoriais e neuromusculares (VAN DER OOST et al., 2016). Os receptores de acetilcolina são precocemente expressos no peixe-zebra, desde o estágio embrionário, podendo clivar rapidamente

a acetilcolina em colina e acetato. É uma enzima crítica para a transmissão sináptica entre neurônios tanto em sinapses colinérgicas quanto entre junções neuromusculares. Estas atividades configuram a base de muitas das funções biológicas essenciais, tais como o batimento cardíaco, respiração, digestão, e a atividade cerebral. A acetilcolinesterase foi descrita como um biomarcador bem estabelecido para vários contaminantes ambientais (FISCHER et al., 2015; ZIRGER et al., 2003).

1.4.4 Biomarcadores de Estresse Oxidativo (ROS)

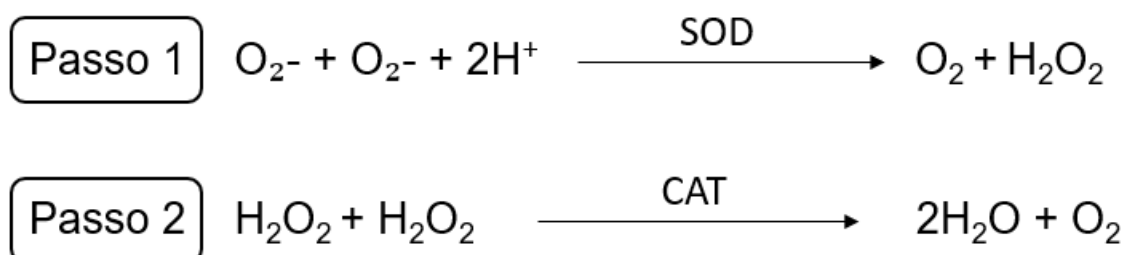
Biomarcadores são caracterizados por processos biológicos quantificáveis que refletem a interação complexa entre os organismos e um perigo potencial (por exemplo, químico, físico ou biológico) (HAVERROTH et al., 2015). Mudanças em nível molecular ou celular em peixes foram propostas como uma abordagem sensível de “alerta precoce” para avaliações de qualidade do ambiente aquático (VAN DER OOST et al., 2016). Efeitos de contaminantes na biota podem estar associados à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem induzir estresse oxidativo em organismos aquáticos. Esse estresse oxidativo se refere ao desequilíbrio devido ao excesso de ROS ou oxidante na capacidade da célula de promover uma resposta antioxidante eficaz (HAVERROTH et al., 2015). Os biomarcadores são promissores, demonstrando que os agentes tóxicos entraram nos organismos, são distribuídos entre os tecidos, provocando um efeito tóxico em alvos críticos (SHUGART et al., 1992). Neste estudo foram avaliados 3 biomarcadores, sendo dois de defesa e um de efeito.

A glutathione S-transferases (GST) desempenha um papel fisiológico no início do sistema de desintoxicação. A GST catalisa a reação de xenobióticos eletrofílicos com o grupo -SH da glutathione, neutralizando seus sítios eletrofílicos e tornando os produtos mais solúveis em água. Os conjugados de glutathione são metabolizados pela clivagem dos resíduos de glutamato e glicina, seguida pela acetilação do grupo amino livre resultante do resíduo cisteinil, para produzir o produto final, um ácido mercaptúrico. Os ácidos mercaptúricos, isto é, derivados S-alquilados de N-

acetilcisteína, são então excretados prevenindo sua interação com proteínas celulares e ácidos nucleicos. A GST pode ser considerada um biomarcador de defesa, constituindo uma primeira barreira contra a entrada de substâncias tóxicas no organismo, realizando a biotransformação de xenobióticos e facilitando sua eliminação no organismo. O aumento nos níveis da enzima corresponde à uma tentativa de superar o estresse produzido por toxicantes (VIEIRA et al., 2009).

A catalase (CAT) é a enzima responsável por metabolizar o peróxido de hidrogênio, transformando-o em duas moléculas de água e uma de oxigênio (Figura 3). O peróxido de hidrogênio é uma espécie reativa que tem ação em proteínas e lipídeos, provenientes principalmente da atividade da superóxido dismutase (SOD).

Figura 3: Reação de transformação do radical superóxido em água e oxigênio realizado pelas enzimas superóxido dismutase e catalase.



Fonte: Autor

O aumento destes radicais é uma consequência direta da bioativação de xenobióticos, principalmente por enzimas como da citocromo P450. A atividade da catalase, pode ser então considerada, assim como a GST, um biomarcador de defesa, visto que sua ação é preventiva ao dano de macromoléculas celulares (JEMEC et al., 2010; OTITOJU; ONWURAH, 2007).

A peroxidação lipídica (LPO), ou a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, é uma consequência do estresse oxidativo, sendo assim um

biomarcador de efeito, indicando que o sistema de defesa não foi suficiente para prevenir o dano celular. O processo de LPO prossegue por uma reação em cadeia e, como no caso do ciclo redox, demonstra a capacidade de uma única espécie radical de propagar uma série de reações bioquímicas deletérias. Numerosos estudos demonstraram aumentos de LPO em vários tecidos de espécies de peixes expostas *in vivo* a uma variedade de produtos químicos, como o sunfish e bluegill expostos ao antraceno e à luz ultravioleta, portanto a LPO é um ótimo indicador de estresse oxidativo (VAN DER OOST et al., 2016).

2. Objetivo

2. OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo geral avaliar o retardante de chama dietil fosfinato de alumínio (ALPI), uma alternativa para substituição de outros retardantes mais tóxicos disponíveis no mercado. Paralelamente, testar os mesmos parâmetros em um dos congêneres da classe dos Difenil Éteres Polibromados (PBDEs), o BDE-47, utilizando o peixe-zebra como organismo modelo.

Para tanto, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Definir das concentrações de teste para os dois compostos, levando em consideração a solubilidade em seus respectivos solventes, buscando simular exposições agudas e ambientais;
- Avaliar a toxicidade aguda, averiguando alterações morfológicas de letalidade, subletalidade e teratogenicidade nos estágios iniciais de desenvolvimento utilizando estágio embrio-larval de *zebrafish*;
- Quantificar a atividade enzimática de biomarcadores de defasa e avaliação de efeitos causados por espécies reativas de oxigênio utilizando estágio embrio-larval de *zebrafish*;
- Avaliar alterações neurocomportamentais e neurotóxicas utilizando estágio embrio-larval de *zebrafish*.
- Comparar os resultados dos retardantes de chama estudados, visando avaliar a segurança na substituição de BDEs pelo ALPI.

3. Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Agentes químicos testados e soluções estoque

As substâncias químicas testadas foram: Retardante de chama bromado PBDE - congênere BDE-47 - 2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter – AccuStandard – CAS# 5436-43-1; Retardante de chama fosforado Dietil fosfinato de alumínio – ALPI – Exolit® OP 1230 – Clariant CAS# 225789-38-8; 3,4-dicloroanilina na concentração de 4,0 mg/L (DCA - Sigma-Aldrich) – CAS# 95-76-1 que foi utilizado como controle positivo para o *Fish Embryo Acute Toxicity* e para os ensaios de biomarcadores; e 1,3,7-Trimetilxantina (Cafeína – Sigma-Aldrich) - CAS# 58-08-2 utilizado como controle positivo no teste enrolamento da cauda.

As soluções estoques do BDE-47 foram preparadas em dimetil sulfóxido 100% (DMSO – Sigma-Aldrich) na concentração de 3000mg/L (Solução estoque mais concentrada) atingindo o limite de sua solubilidade, e posteriormente, diluídas em água padrão ISO-7346, recomendada para ensaios em *Danio rerio* pela *guideline* 236 da OECD (OECD, 2013). A solução estoque do ALPI foi diretamente preparada em água padrão ISO-7346, na concentração de 600mg/L e colocada em agitador do tipo Roller *overnight* (aproximadamente 18h de agitação) até a completa dissolução e então, diluído para as concentrações testadas.

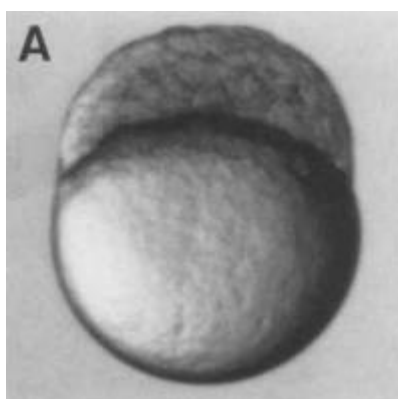
Composição da água padrão ISO-7346: Para cada litro de água de osmose reversa utilizou-se 294,0 mg de cloreto de cálcio; 123,3 mg de sulfato de magnésio; 63,0 mg de bicarbonato de sódio e 5,5 mg de cloreto de potássio. A água padrão ISO-7346 e o DMSO (diluído em água padrão ISO-7346) foram utilizados como controles negativos para o ALPI e BDE-47 respectivamente.

As concentrações de trabalho definidas buscam avaliar um amplo alcance de efeitos que os compostos podem apresentar, assim, havendo uma intersecção nas concentrações entre o ALPI e o BDE-47, levando em consideração o limite de solubilidade e os requisitos para cada teste em específico.

3.2 Manutenção do peixe-zebra e coleta dos embriões

O peixe-zebra (*D. rerio*) foi obtido no biotério de Toxicologia Ambiental da FCFRP/USP, sob responsabilidade da Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira. Os adultos foram mantidos em sistema flow-through (ZebTec, Tecniplast, Itália) com água de osmose reversa em condições padrão (pH $7,5 \pm 0,5$, temperatura 26 ± 1 °C, oxigênio dissolvido a 95% saturação e condutividade 750 ± 50 $\mu\text{s} / \text{cm}$, Fotoperíodo de ciclo claro / escuro de 14:10 h), alimentados diariamente com ração comercial (TetraMin Tropical Flakes®). Para a obtenção dos ovos, criadores de peixe-zebra foram montados em aquário de 1 L na proporção de 2:1 de macho / fêmea na tarde anterior. Quando a luz se acende de manhã (início de fotoperíodo claro), os peixes foram deixados a desovar por período de aproximadamente 1 h, em seguida os ovos foram coletados e lavados em água de osmose reversa autoclavada. Ovos fertilizados durante o estágio de blástula (4-64 / célula) (Figura 4) foram selecionados aleatoriamente em estereomicroscópio (Stemi 508, Zeiss) para os experimentos subsequentes.

Figura 4: Embrião de *zebrafish* em estágio de blástula, com 2,5 horas pós-fertilização



Fonte: “*Stages of Embryonic Development of the Zebrafish*”, Kimmel, 1995

A eutanásia dos animais foi realizada de acordo com o Guideline for Use of Zebrafish do *National Institutes of Health* (2009) e Resolução Normativa nº 37 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2018). Para os animais entre 1 e 4 dias pós-fertilização, a eutanásia é realizada por imersão em nitrogênio líquido. Segundo a Resolução Normativa nº 37 do CONCEA, o congelamento pela imersão em nitrogênio líquido é uma forma de eutanásia recomendada para peixes de pequeno porte (que não ultrapassam 200 mg). Para os animais com idade ≥ 8 dias pós-fertilização (no caso de animais adultos do biotério doentes), a eutanásia é realizada por imersão em solução de anestésico sulfonato metano de tricaina (MS222), na concentração de 300 mg/L (overdose), método recomendado pela Resolução Normativa nº 37 do CONCEA para Osteichthyes (peixes ósseos), mantendo os animais imersos por 10 minutos até cessar o movimento opercular. A tamponagem da solução de MS222 é recomendada apenas em concentrações superiores a 500 mg/L, desta forma não será necessário tamponá-la. Os animais adultos apenas sofrerão eutanásia se estiverem doentes, pois os animais saudáveis serão mantidos no biotério para experimentos futuros.

Todo o protocolo de experimentação foi submetido à aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP). (Nº do processo:19.1.845.60.4 – Anexo I) Aprovado na reunião do dia 01/10/2019.

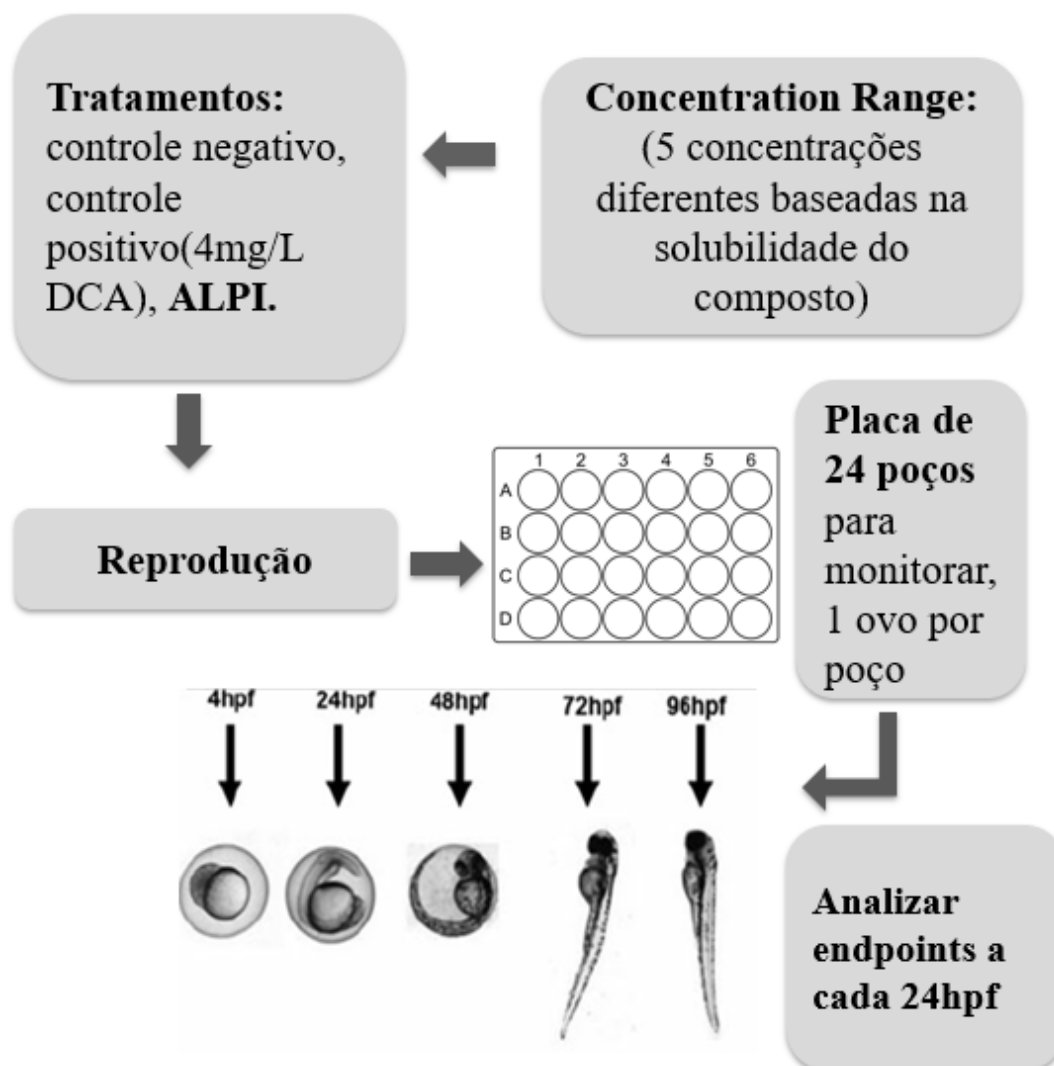
3.3 Teste de Toxicidade Aguda

Após testar a solubilidade do ALPI em diferentes condições, foram definidas as concentrações de trabalho: 3 µg/L; 30 µg/L; 300 µg/L; 3000 µg/L; 30000 µg/L. Nota-se que o BDE-47 não foi testado, pois outros alunos do grupo já haviam feito o teste para diferentes congêneres de PBDEs incluindo o BDE-47, assim, os resultados obtidos com o ALPI são comparativos a este estudo. Para o controle negativo do ALPI utilizou-se água ISO-7346. Para o controle positivo foi utilizado 3,4-dicloroanilina na concentração de 4,0 mg/L.

O método *Fish Embryo Acute Toxicity Test* (FET test) com zebrafish é baseado na guideline OECD (nº 236) com modificações (Figura 5). O ensaio de

toxicidade utilizando embriões e larvas de peixe-zebra foi o primeiro teste realizado e teve início com a coleta seletiva de ovos fertilizados (em estágio de blástula). Os ovos foram distribuídos em placas para cultura com 24 poços, uma placa para tratamento, e então dispostos individualmente nos poços com 2,0 mL de cada concentração da solução dos retardantes de chama e o mesmo para os controles negativo e positivo. Os experimentos foram realizados em triplicata e cada réplica foi constituída por 20 embriões para o controle negativo, controle positivo e para cada concentração, totalizando assim os 60 ovos por tratamento. As placas então foram incubadas a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e em ciclo 14h-h claro e 10-h escuro e o desenvolvimento dos embriões de peixe-zebra foram avaliados nos períodos de 24, 48, 72 e 96 hpf (horas pós fertilização) utilizando um estereomicroscópio (SMZ-168, Motic). Para avaliar a toxicidade dos compostos em estudo foram utilizados indicadores de letalidade, sub-letalidade e teratogenicidade de acordo com variações morfológicas observadas em todos os períodos descritos anteriormente, e assim, acompanhando cada embrião individualmente e suas mudanças ao longo deste período. A mortalidade foi identificada por coagulação dos embriões, irregularidades na formação dos somitos, problemas na liberação da cauda e perda de batimentos cardíacos. Já os indicadores de sub-letalidade incluíram as malformações de embriões e larvas definidas por alterações no saco vitelino, edemas do pericárdico e do saco vitelino, deformações esqueléticas e a incapacidade de eclosão. A distinção entre desenvolvimento embrionário normal e anormal foi estabelecida de acordo com a descrição da embriogênese do zebrafish publicada por Kimmel et al. (1995). (KIMMEL et al., 1995)

Figura 5: Esquema do ensaio para avaliação da toxicidade aguda (FET test)



Fonte: Autor

3.4 Ensaio de movimentação espontânea (“tail coiling”)

As concentrações dos tratamentos utilizadas neste teste para o BDE-47 foram maiores que nos outros ensaios realizados. Isso por conta da concentração final de 0,1% de DMSO v/v, que foi estabelecido pelo nosso grupo de pesquisa recentemente e publicado (OLIVEIRA et al., 2021), sendo possível utilizar concentrações mais altas do solvente sem interferir nos parâmetros analisados.

Para o ensaio da avaliação de movimentação caudal (*tail coiling*), os ovos em estágio de blástula foram colocados em placas de cultura de 6 poços preenchidos com 10mL de soluções teste dos retardantes de chama, controles negativo e positivo, sendo o n = 20 ovos por tratamento em cada replicata. O teste foi realizado em triplicata, totalizando 60 ovos por tratamento. As placas foram incubadas a 26 ± 1 °C, com fotoperíodo de ciclo 14-h claro 10-h escuro. Os testes foram realizados em dois horários diferentes: 22hpf e 26hpf, buscando avaliar padrões diferentes de movimentação do embrião, visto que, após 26hpf um outro padrão de movimentação é observado, chamado de “resposta induzida pelo toque” (SAINT-AMANT; DRAPEAU, 1998). Após 28 hpf ocorre uma drástica diminuição deste movimento espontâneo, podendo causar uma variabilidade muito grande nos resultados o que torna a análise inviável.

Após o grupo de 20 embriões serem transferidos para uma lâmina escavada ocorreu um breve período de aclimação de 2 minutos, os embriões então foram monitorados e gravações de 3 min foram realizadas usando um estereomicroscópio (Stemi 508, Zeiss) com uma câmera acoplada (AxioCam IC Zeiss, Alemanha). A gravação foi realizada com lente de aumento 0,65x. Os vídeos foram salvos no formato AVI, com resolução de 10 frames por segundo (fps) e posteriormente analisados pelo software DanioScope (Noldus, versão 1.1). Para avaliar a movimentação, o software reconhece automaticamente os embriões e seleciona-os (no córion) como uma zona de interesse em que a atividade é automaticamente registrada e medida. A resposta da atividade é dada por diferentes parâmetros, neste estudo foi avaliado: Porcentagem de tempo que o embrião estava se movendo ("burst activity"), a soma de todas as durações de movimento ("mean burst duration") e o número de rajadas por minuto ("burst count/minute").

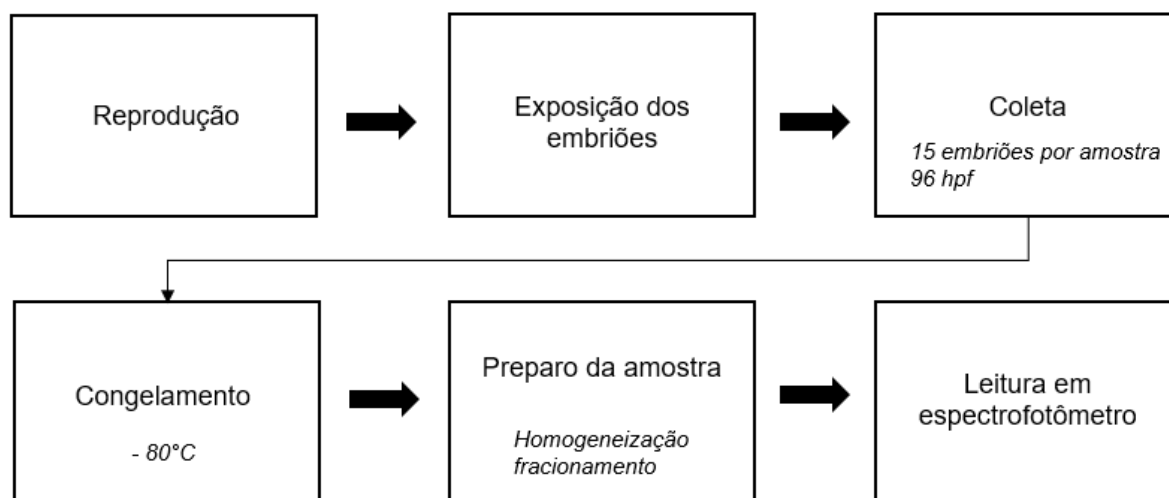
Por se tratar de uma análise comportamental e visando diminuir a variabilidade dos resultados, foram realizadas as seguintes padronizações: Para cada replicata, todos os embriões de ambos compostos (BDE-47 e ALPI) assim como os controles, foram adquiridos do mesmo lote de reprodução. A análise de cada replicata durou em média 1 hora, e sempre foi realizada nos mesmos horários. A ordem de gravação dos tratamentos foi diferente para cada replicata. A temperatura da sala foi mantida à 25°C.

Apenas 3 concentrações equivalentes de cada composto foi analisada (3µg/L; 300 µg/L e 3000 µg/L) visando diminuir o tempo de gravação do teste. Isso foi feito devido à ensaios prévios, onde houve grande variabilidade devido ao longo tempo de gravação e as concentrações selecionadas foram as mais significativas no ensaio prévio. Foi incluída a cafeína a 300mg/L como controle positivo do teste. A padronização da cafeína foi estabelecida pelo estudo publicado de nosso grupo (OLIVEIRA et al., 2021),

3.5 Biomarcadores

O protocolo utilizado para ensaio de biomarcadores em peixe-zebra foi implantado no laboratório em uma parceria com o Prof. Dr. Carlos Gravato da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa com modificações. Tanto o protocolo para o ensaio de estresse oxidativo (DOMINGUES; GRAVATO, 2018) quanto para atividade da acetilcolinesterase (GRAVATO et al. 2021) estão disponíveis na literatura. O esquema geral das etapas do protocolo está resumido na abaixo (Figura 6).

Figura 6: Esquema geral das etapas para ensaio de biomarcadores em peixe-zebra



Fonte: Autor

3.5.1 Exposição dos embriões e congelamento

Os embriões foram expostos em soluções de 5 diferentes concentrações para cada composto, as mesmas utilizadas no teste de toxicidade aguda. Os controles negativos para BDE-47 e ALPI foram DMSO 0,1% e água ISO-7346 respectivamente, e o controle positivo foi DCA 4mg/L. A exposição foi realizada em placas de cultura de 6 poços, sendo cada amostra composta por 15 ovos e um total de 6 amostras para cada tratamento, totalizando n= 90 por tratamento. As placas foram incubadas a 26 ± 1 °C, com fotoperíodo de ciclo 14-h claro 10-h escuro e então as larvas foram transferidas para tubos criogênicos, onde ficam expostas ao gelo para serem anestesiadas (aproximadamente 2 minutos). Assim que as larvas param de se movimentar no tubo, todo líquido é retirado e as amostras foram rapidamente colocadas em nitrogênio líquido (\approx 20s), e imediatamente armazenadas em -80 °C até a etapa de homogeneização.

3.5.2 Homogeneização das amostras

As soluções de homogeneização foram previamente preparadas, sendo elas: Tampão K-fosfato 0,2 M (pH 7,4) para manter o pH fisiológico e o BHT 4% (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol, MW 220,35, CAS 128-37-0, \geq 99%, Sigma-Aldrich # B1378), um antioxidante que interrompe a reação em cadeia da peroxidação lipídica.

Para a homogeneização, as amostras foram descongeladas e mantidas em gelo durante todo processo para evitar a desnaturação das proteínas. Cada amostra foi homogeneizada em 800 μ L de água ultra pura com um homogeneizador sônico (2 x 10 s, amplitude de 40%, 5 watts). As alíquotas foram separadas do tecido homogeneizado de cada amostra em microtubos de 1,5 mL da seguinte forma:

- a. 200 μ L para LPO e adicionado 4 μ L de BHT 4%
- b. 500 μ L para a fração de estresse + 500 μ L de tampão K-fosfato 0,2 M, pH 7,4 (\approx para pH in vivo). As amostras de LPO foram armazenadas imediatamente a -80 °C.

A homogenização da fração de estresse foi realizada centrifugando o homogeneizado de tecido de cada amostra a 10.000 g por 20 minutos a 4 °C para isolar o sobrenadante pós-mitocondrial (PMS). A centrifugação diferencial separa a fração S9 que contém enzimas metabolizantes de xenobióticos, onde estão disponíveis as enzimas de interesse para este estudo. As amostras do PMS foram fracionadas em 5 microtubos e congelados a -80 °C:

- a. 250 µL para GST (glutathione S-transferase)
- b. 100 µL para CAT (catalase)
- c. 100 µL para quantificação de proteína S9
- d. 250 µL para AChE (colinesterase)

3.5.3 Quantificação de Proteína S9

O método de ligação de corante de Bradford é um método rápido e sensível para a quantificação de proteína, utilizando o princípio da ligação proteína-corante. O azul brilhante de Coomassie G-250 é um corante vermelho catiônico que se liga de forma estável à proteína em condições ácidas por interações de Van der Waals e ligação iônica, mudando para o aniônico forma azul ($A_{max} = 595 \text{ nm}$) (BRADFORD, 1976).

A quantificação de proteínas é necessária para identificar a variação da atividade enzimática nos ensaios de biomarcadores da fração de estresse. Por conta disso apenas as proteínas disponíveis na fração S9 são quantificadas.

Primeiramente foi preparada a solução de proteína padrão de 1 mg/mL em água ultra-pura a partir da γ -globulina de sangue bovino (CAS 9007-83-4, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich # G5009). A solução de proteína padrão então foi diluída para obter os pontos que fazem a curva:

- i. P0: 0 mg / mL (10 µL de água ultra pura)
- ii. P1: 0,2 mg / mL (2 µL de solução de proteína padrão + 8 µL de água ultra pura)
- iii. P2: 0,5 mg / mL (5 µL de solução de proteína padrão + 5 µL de água ultra pura)
- vi. P3: 1 mg / mL (10 µL de solução de proteína padrão)

A leitura foi realizada mantendo a primeira coluna da microplaca vazia por ter a chance de ocorrer erro de fabricação que pode interferir na leitura, isso foi mantido para todo o procedimento dos biomarcadores. Para a obtenção da curva padrão foi pipetado 10 µL das concentrações de proteína padrão (P0, P1, P2, P3) como ilustrado na figura abaixo (Figura 7). Nos demais poços foram pipetadas 50 µL das amostras, e por fim, utilizando uma pipeta multicanal, foi pipetado 250 µL de reagente de Bradford (Sigma-Aldrich # B6916) diretamente na microplaca e protegido da luz para todos os poços (curva padrão e poços de amostras). A leitura foi realizada em absorbância a 600 nm. Foram feitas 4 leituras para cada amostra.

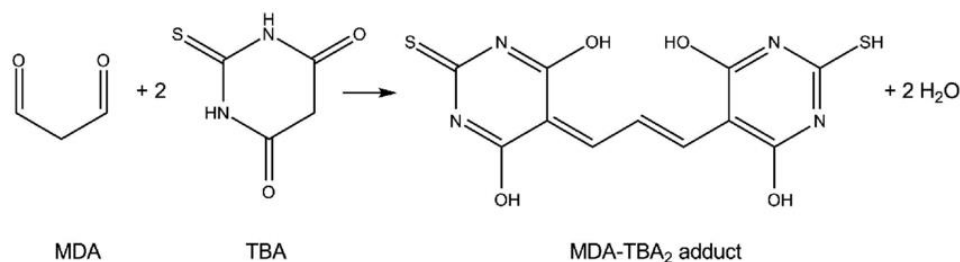
Figura 7: Organização da microplaca para a quantificação de proteína S9 em larvas de peixe-zebra expostas às diferentes concentrações de retardantes de chama. E: vazio, P0;P1;P2;P3: pontos da curva da proteína padrão.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E	P0	P1	P2	P3	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7
B	E	P0	P1	P2	P3	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7
C	E	P0	P1	P2	P3	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7
D	E	P0	P1	P2	P3	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7
E	E	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	3.1	3.2	3.3	3.4
F	E	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	3.1	3.2	3.3	3.4
G	E	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	3.1	3.2	3.3	3.4
H	E	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	3.1	3.2	3.3	3.4

Fonte: Protocol biomarkers – Oxidative stress in zebrafish, Flávia Abe - comunicação pessoal.

3.5.4 Peroxidação Lipídica (LPO)

O ensaio de peroxidação lipídica avalia a quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (ensaio TBARS). A solução TBA 0,73%, adicionada às amostras, é a responsável pela reação com o malonaldeído (MDA) um aldeído de cadeia curta, produto primário da peroxidação lipídica, assim, uma molécula de MDA reage com duas moléculas de TBA gerando uma colocação amarela ou alaranjada. O TCA garante o pH ácido para que a reação ocorra. A reação foi descrita por Bird and Drapper, 1984 (Figura 8). A quantificação de peroxidação lipídica é mensurada por TBARS (pmol/larva) (BIRD; DRAPER, 1984).

Figura 8: Reação TBARS para quantificação de peroxidação lipídica

Fonte: Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination, Bird and Drapper 1984

Soluções preparadas para o ensaio: Tampão K-fosfato 0,1 M, pH 7,4; Solução TCA 100% (ácido tricloroacético MW 163,39, CAS 76-03-9, ≥99%, Sigma-Aldrich # T6399); Solução TBA 0,73% (ácido 2-tiobarbitúrico MW 144,15, CAS 504-17-6, ≥98%, Sigma-Aldrich # T5500). Para a solução LPO branco foi utilizado o BHT 4% preparado previamente na homogeneização das amostras.

A sala foi mantida escura durante o procedimento. Na capela foi adicionado 100 µL de TCA 100% frio a todos os microtubos (amostras e brancos). Este processo foi feito com as amostras em gelo. Todos os microtubos foram então agitadas em vortex e posteriormente adicionado 1000 µL de solução de TBA 0,73% à temperatura ambiente (25 °C). Após outra agitação os tubos foram colocados em um suporte metálico coberto com papel alumínio e levados a estufa a 100 °C durante 1 hora. Todos os microtubos foram furados na tampa com uma agulha para evitar explosão dos mesmos. Após retirados, os microtubos foram mantidos até atingirem a temperatura ambiente. Os microtubos foram centrifugados a 11500 rpm por 5 minutos a 25 °C. Na microplaca de 96 poços foi pipetado 300 µL do sobrenadante (brancos e amostras) para cada poço com cuidado para não pegar o pallet. Foram feitas 3 repetições para cada amostra. A Leitura foi feita com a absorbância a 535 nm. A placa foi organizada conforme ilustrado abaixo (Figura 9).

Figura 9: Organização da microplaca para peroxidação lipídica em larvas de peixe-zebra expostas às diferentes concentrações de retardantes de chama. E: vazio, B: branco.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E	B ₁	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	2.1	2.2	2.3	A	E	B ₂	3.7	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7	5.1	5.2
B	E	B ₁	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	2.1	2.2	2.3	B	E	B ₂	3.7	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7	5.1	5.2
C	E	B ₁	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	2.1	2.2	2.3	C	E	B ₂	3.7	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7	5.1	5.2
D	E	B ₁	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	2.1	2.2	2.3	D	E	B ₁	3.7	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7	5.1	5.2
E	E	B ₁	2.4	2.5	2.6	2.7	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	E	E	B ₂	5.3	5.4	5.5	5.6	5.7	6.1	6.2	6.3	6.4	6.5
F	E	B ₁	2.4	2.5	2.6	2.7	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	F	E	B ₂	5.3	5.4	5.5	5.6	5.7	6.1	6.2	6.3	6.4	6.5
G	E	B ₁	2.4	2.5	2.6	2.7	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	G	E	B ₂	5.3	5.4	5.5	5.6	5.7	6.1	6.2	6.3	6.4	6.5
H	E	B ₁	2.4	2.5	2.6	2.7	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	H	E	B ₁	5.3	5.4	5.5	5.6	5.7	6.1	6.2	6.3	6.4	6.5

Fonte: Protocol biomarkers – Oxidative stress in zebrafish, Flávia Abe - comunicação pessoal.

3.5.5 Catalase (CAT)

A enzima catalase catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A decomposição do H₂O₂ pode ser acompanhada por espectroscopia ultravioleta, devido à absorvância do H₂O₂ nesta região. Conforme o H₂O₂ é decomposto, ocorre uma diminuição na absorvância a 240 nm. O tampão de fosfato de potássio (0,05 M, pH 7,0) garante o pH ótimo para atividade enzimática. A atividade específica da catalase a 25 °C é definida pela variação cinética (final – inicial) em termos de micromoles de H₂O₂ consumidos por minuto por miligrama de amostra de proteína (CLAIBORNE 1985).

Soluções preparadas: Tampão de homogeneização (K-fosfato, 0,1 M, pH 7,4); Tampão de fosfato de potássio (0,05 M, pH 7,0); Tampão de reação (peróxido de hidrogênio, MW 34,0147, CAS 7722-84-1, 30% p / v em H₂O, Sigma-Aldrich # H3410).

A leitura foi realizada utilizando microplaca para luz ultravioleta (placas de poliestireno que absorvem os raios ultravioleta e os resultados de inclinação). As placas foram preparadas em 2 etapas (lados esquerdo e direito) para evitar novas reações e, portanto, duas corridas cinéticas são feitas em cada placa (da esquerda para a direita (Figura 10)).

A partir da segunda coluna foi pipetado 10 μ L de tampão de homogeneização (K-fosfato, 0,1 M, pH 7,4) para fazer os brancos e 140 μ L de K-fosfato (0,05 M, pH 7,0) para cada poço. Nas próximas colunas, foi pipetado 10 μ L de amostra e 140 μ L de K-fosfato (0,05 M, pH 7,0) para cada poço. Foram feitas 4 repetições para cada amostra, posteriormente foi adicionado 150 μ L de tampão de reação a cada poço com uma pipeta multicanal até o meio da microplaca. Esta etapa foi executada o mais rápido possível para a leitura ser feita de forma rápida com a absorbância a 240 nm durante 2 minutos (a cada 20 s), somente o lado esquerdo. Depois foram repetidas as etapas com a outra metade da microplaca, lendo o lado direito.

Figura 10: Organização da microplaca para atividade da catalase em larvas de peixe-zebra expostas às diferentes concentrações de retardantes de chama. E: vazio, B: branco.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E	B ₁	1.1	1.2	1.3	1.4	B ₂	1.5	1.6	1.7	2.1	2.2	A	E	B ₃	3.5	3.6	3.7	4.1	B ₄	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6
B	E	B ₁	1.1	1.2	1.3	1.4	B ₂	1.5	1.6	1.7	2.1	2.2	B	E	B ₃	3.5	3.6	3.7	4.1	B ₄	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6
C	E	B ₁	1.1	1.2	1.3	1.4	B ₂	1.5	1.6	1.7	2.1	2.2	C	E	B ₃	3.5	3.6	3.7	4.1	B ₄	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6
D	E	B ₁	1.1	1.2	1.3	1.4	B ₂	1.5	1.6	1.7	2.1	2.2	D	E	B ₃	3.5	3.6	3.7	4.1	B ₄	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6
E	E	B ₁	2.3	2.4	2.5	2.6	B ₂	2.7	3.1	3.2	3.3	3.4	E	E	B ₃	4.7	5.3	5.4	5.5	B ₄	5.6	5.7	6.1	6.2	6.3
F	E	B ₁	2.3	2.4	2.5	2.6	B ₂	2.7	3.1	3.2	3.3	3.4	F	E	B ₃	4.7	5.3	5.4	5.5	B ₄	5.6	5.7	6.1	6.2	6.3
G	E	B ₁	2.3	2.4	2.5	2.6	B ₂	2.7	3.1	3.2	3.3	3.4	G	E	B ₃	4.7	5.3	5.4	5.5	B ₄	5.6	5.7	6.1	6.2	6.3
H	E	B ₁	2.3	2.4	2.5	2.6	B ₂	2.7	3.1	3.2	3.3	3.4	H	E	B ₃	4.7	5.3	5.4	5.5	B ₄	5.6	5.7	6.1	6.2	6.3

Fonte: Protocol biomarkers – Oxidative stress in zebrafish, comunicação pessoal.

3.5.6 Glutathione S-Transferase (GST)

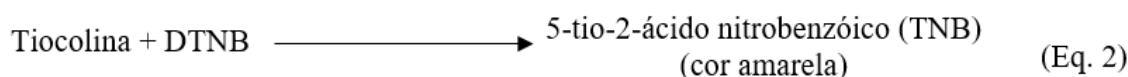
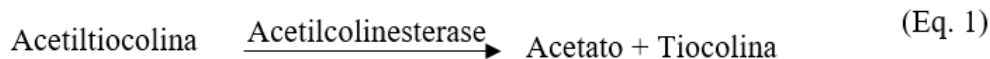
O ensaio GSH (glutathione) é baseado na reação catalisada por GST entre GSH (glutathione reduzida) e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), que forma o conjugado 2,4-dinitrofenil-S-glutathione (CDNB-SG). A atividade GST é determinada medindo a taxa de CDNB-SG, que é proporcional ao aumento da absorbância em 340 nm ao longo do tempo. A atividade enzimática específica é a atividade dividida pela massa da proteína (nmol / min / mg de proteína) (PABST et al., 1974).

Soluções preparadas: Tampão K-fosfato 0,1 M, pH 7,4 para os brancos. Tampão de reação: tampão de fosfato de potássio (0,2 M, pH 6,5); Solução GSH 10 mM (L-Glutationa reduzida, MW 307,32, CAS 70-18-8, ≥98%, Sigma-Aldrich # G4251) e solução CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, MW 202,55, CAS 97-00-7, ≥99%, Sigma-Aldrich # 237329). A solução de reação foi mantida em temperatura ambiente e feita quando as placas estavam prontas para leitura. A organização para leitura da placa foi idêntica à LPO (Figura 9). Na segunda coluna foi pipetado 50 µL de tampão de homogeneização (K-fosfato, 0,1 M, pH 7,4) para fazer os brancos. Nas próximas colunas foi pipetado 50 µL de amostra e foram feitas 4 repetições, posteriormente foi adicionado 250 µL da solução de reação a cada poço com uma pipeta multicanal. A leitura foi realizada com absorbância a 340 nm a cada 20 segundos durante 5 minutos.

3.5.7 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

O ensaio de determinação da atividade da AChE por método espectrofotométrico, conhecido como teste de Ellman (ELLMAN et al., 1961), é baseado na velocidade de formação da tiocolina por meio da hidrólise do substrato acetiltiocolina (análogo à ACh) pela enzima acetilcolinesterase (AChE). A tiocolina reage com o DTNB (reagente de Ellman), formando dissulfetos e o ânion amarelo TNB (nitrobenzoato) (Figura 11). A atividade da AChE é definida pela variação cinética (final – inicial) em termos de micromoles de H₂O₂ consumidos por minuto por miligrama de amostra de proteína. (ELLMAN et al., 1961)

Figura 11: Teste de Ellman para determinação da atividade da acetilcolinesterase



Fonte: Autor

Soluções preparadas: Tampão K-fosfato 0,1 M, pH 7,4 para os brancos. Tampão de reação: tampão K-fosfato (0,1 M, pH 7,2); Solução de acetilcolina 0,075M (acetato de iodeto de trimetilamônio, MW 289,18, CAS 1866-15-5, ≥98%, Sigma-Aldrich); Solução DTNB (5-5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico CAS 68-78-3 ≥98%, Sigma-Aldrich). O tampão foi mantido em temperatura ambiente e protegido da luz.

Para a leitura, a organização da placa foi idêntica a Figura 2. Na segunda coluna foi pipetado 50 µL de tampão de homogeneização (K-fosfato, 0,1 M, pH 7,4) para fazer os brancos, e nas colunas posteriores foi pipetado 50 µL de amostra. Foram feitas 4 repetições por amostra. Foi então adicionado 250 µL de tampão de reação a cada poço com uma pipeta multicanal. A leitura da placa foi realizada em absorbância de 414 nm a cada 20 segundos durante 5 minutos.

3.6 Análise estatística

A análise estatística dos dados experimentais foi realizada usando o software Graph Pad 5.01 (GraphPad software, San Diego, CA, EUA). Para todos os ensaios a distribuição normal dos valores foi verificada, sendo assim, os dados foram analisados por *one-way* ANOVA paramétrico, complementado com teste de Bartlett para verificação de homoscedasticidade, seguido pelo teste pós teste de Dunnett, verificando diferenças significativas entre os tratamentos quando

comparados com o controle negativo. Para comparação direta entre os controles positivo e negativo foi utilizado o unpaired t-test, que compara dois grupos independentes ou não relacionados para determinar se há uma diferença significativa entre eles.

Em todos os experimentos, o resultado foi considerado significativo com $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de Toxicidade Aguda “*Fish Embryo Acute Toxicity Test*” (FET test)

Os resultados obtidos para o ALPI foram comparados com dados de toxicidade aguda obtidos por nosso grupo anteriormente para três congêneres diferentes de BDE, os congêneres testados foram BDE-47; BDE-99 e o BDE-154. Estes dados estão publicados no artigo “*A comparison of developmental toxicity of brominated and halogen-free flame retardant on zebrafish*”. (ABE et al., 2021) O grupo controle negativo apresentou desenvolvimento embrionário normal conforme descrito por Kimmel et al. (1995) e a taxa de mortalidade permaneceu abaixo de 10% durante todo o experimento. DCA 4 mg/L induziu mortalidade acima de 30%, atendendo aos critérios de validação do Diretriz 236 da OCDE. (OECD 2013) O ALPI, diferente dos BDEs, foi analisado até 96hpf, pois testes preliminares não indicaram nenhuma alteração da inflação da beixiga natatória, critério analisado apenas em 144hpf, assim, não havendo justificativa para conduzir o teste a este ponto. Portanto este trabalho não leva em consideração resultados após 96hpf.

Nenhuma mortalidade significativa foi observada em embriões/larvas expostas a BDE-47, ALPI, BDE-99 e BDE-154 em qualquer concentração testada até 96hpf. Além disso, para o ALPI nenhum efeito subletal ou teratogênico significativo foi observado no desenvolvimento de embriões / larvas até 96hpf em comparação com o controle negativo. Os valores de LC50 não puderam ser determinados devido a ausência de mortalidade até a concentração mais alta testada de todos os BDEs e ALPI. Cabe lembrar que a concentração máxima testada, que foi limitada pela solubilidade dos compostos no meio de teste. Embora nenhuma mortalidade significativa tenha sido observada, a exposição ao BDE-47

induziu edemas do saco vitelino e pericárdio na concentração máxima testada (Figuras 12 e 13). Quando analisamos a evolução dos edemas durante desenvolvimento (Tabela 1), observamos que edemas em embriões expostos a 12,1 mg/L de BDE-47 apareceram pela primeira vez a 48 hpf, atingindo 11,7% dos organismos, enquanto nenhum edema foi detectado no grupo de controle. Em 72 hpf, edemas foram reabsorvidos e, portanto, não foram mais detectados.

Os resultados do ALPI e dos BDEs foram avaliados individualmente usando pontos finais de letalidade, subletalidade e teratogenicidade, conforme recomendado por Nagel. (NAGEL, 2002) Os *endpoints* analisados em cada etapa do teste estão descritos abaixo (Tabela 2).

Tabela 1: Frequência de ocorrência de edemas (%) nos primeiros estágios de vida do peixe-zebra exposto a Difenil Éteres Polibromados (PBDEs) e dietilfosfinato de alumínio (ALPI). Os edemas localizavam-se no pericárdio e / ou saco vitelínico (n = 60). Edemas foram contados quando observados pela primeira vez, e então não foi recontado até o final do teste, para evitar a contagem do mesmo organismo mais de uma vez. Em organismos com dois tipos de edema (pericárdio e saco vitelino), apenas um foi considerado. * significativo para $p < 0,05$ *** significativo para $p \leq 0,001$.

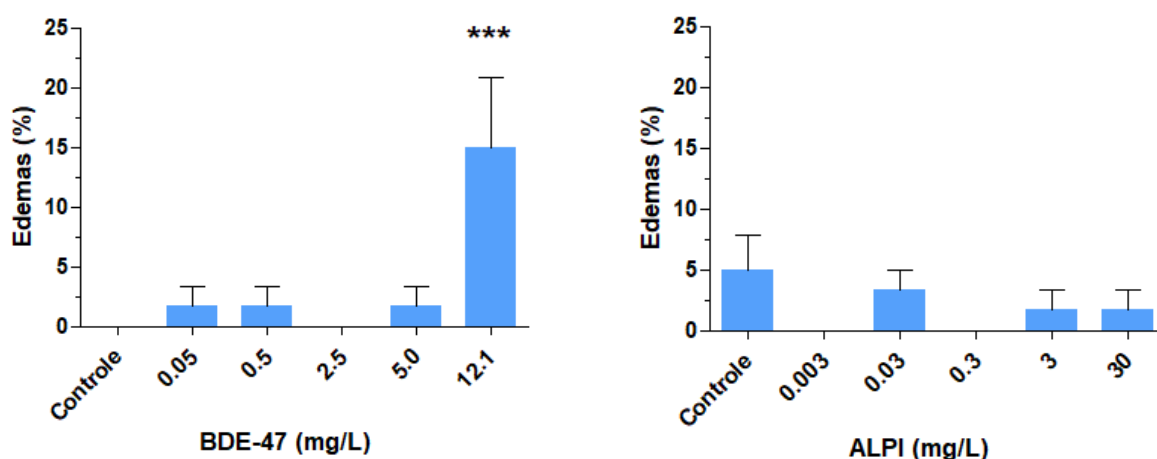
Composto	[mg/L]	48hpf	72hpf	96hpf	TOTAL
BDE-47	0	0	0	0	0
	0,05	1,7	0	0	1,7
	0,5	0	0	0	0
	2,5	0	0	0	0
	5,0	1,7	0	0	1,7
	12,1	12***	0	0	12***
ALPI	0	0	-	5,1	5,1
	0,003	0	-	0	0
	0,03	1,7	-	1,7	3,3
	0,3	0	-	0	0
	3	1,7	-	0	1,7
	30	0	-	1,7	1,7

Fonte: Adaptado do artigo "A comparison of developmental toxicity of brominated and halogen-free flame retardant on zebrafish" *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021.

Tabela 2: *Endpoints* avaliados em cada período de desenvolvimento do estágio embrio-larval de *zebrafish* (Adaptado de NAGEL, 2002).

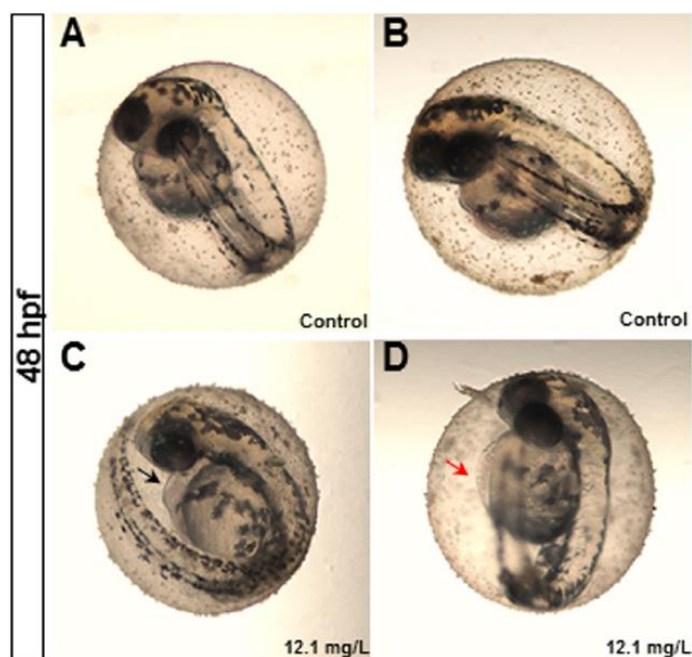
Endpoints	Endpoints			
	24	48	72	96
Coagulação	X	X		X
Não desprendimento da cauda	X	X		X
Ausência de somitos	X	X		X
Ausência de batimentos cardíacos		X		X
Edema cardíaco ou de saco vitelínico		X		X
Ausência de pigmentação		X		X
Deformidades esqueléticas				X
Não eclosão			X	X

Figura 12: Frequência cumulativa de embriões / larvas de peixe-zebra (24-96 h pós-fertilização) após exposição a dietilfosfinato de alumínio (ALPI) e após exposição para congênere de difenil éter polibromado BDE-47 com edemas de pericárdio e saco vitelino. As barras representam as médias e as barras de erro representam o erro padrão das médias (SEM) (n = 60). *** one-way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, p = 0,001 para diferenças significativas entre os grupos exposto e controle.



Fonte: Adaptado do artigo "A comparison of developmental toxicity of brominated and halogen-free flame retardant on zebrafish" *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021.

Figura 13: Efeitos do BDE-47 em embriões / larvas de peixe-zebra em 48h pós-fertilização (hpf). Imagens representativas de embriões do grupo de controle (1% DMSO) (A e B) e exposto a 12,1 mg / L de BDE-47 (B-C) A seta preta indica edema de pericárdio, a seta vermelha indica edema de saco vitelino (aumento de 3,2 / 1,25 x).



Fonte: “A comparison of developmental toxicity of brominated and halogen-free flame retardant on zebrafish” *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021.

Espera-se que a mortalidade para larvas de peixe-zebra para o BDE-47 apareça apenas em 144hpf na concentração de 23,33 mg/L de acordo com o estudo de Usenko et al. 2011 (USENKO et al., 2011). Embora não tenha sido possível calcular a LC50 para o ALPI devido a ausência de mortalidade, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) relatou que a 96h-LC50 do ALPI para peixes-zebra adultos é superior a 100 mg/L, que foi a concentração mais alta testada não apresentando mortalidade. Os estudos estão relatados como confidenciais (EPA 2014).

Efeitos subletais de BDEs no desenvolvimento do peixe-zebra foram observados em estudos anteriores. (HAN et al. 2011) Aqui, em concentrações subletais, embriões/larvas de peixe-zebra foram mais sensíveis à exposição ao BDE-

47, que induziu deformidades morfológicas significativas na concentração mais alta testada, como pericárdio e edema do saco vitelino. Em estudos anteriores, foi relatado o desenvolvimento de edema de pericárdio induzido pela exposição ao BDE-47, mas nenhuma informação foi fornecida sobre sua reabsorção após 96 h de exposição (LIU et al., 2015; PARSONS et al., 2019; ZEZZA et al., 2019). Além disso, o BDE-47 também foi associado à toxicidade vascular (XING et al., 2018) e arritmia cardíaca em embriões/larvas de peixe-zebra expostos (LEMA et al., 2007). O edema pode estar relacionado a vários fatores: insuficiência renal, defeitos de permeabilidade, insuficiência circulatória ou desequilíbrio iônico. Nos estágios iniciais de desenvolvimento, os órgãos não se desenvolveram e a influência de um fator externo pode induzir edema pela interrupção dessas funções (HILL et al., 2003). À medida que os órgãos se tornam mais funcionais, se o dano causado pelo xenobiótico for reversível, eles passam a responder e reverter o edema, o que pode ter acontecido no caso dos BDEs. Sabe-se que existe um padrão de aumento da toxicidade causado pelos BDEs polibromados com a quantidade de átomos de bromo. BDEs com menos bromação, com átomos de bromo na posição orto e sem átomos de bromo na posição meta, apresentam maior potencial tóxico, de acordo com a relação estrutura-atividade (HARJU et al. 2007), isso justifica a maior toxicidade do congênere BDE-47.

Após 96h de exposição ao ALPI, os resultados indicam que este retardante não induz anormalidades morfológicas durante o desenvolvimento do peixe-zebra nas condições testadas. Até o momento, a ocorrência e os níveis ambientais de ALPI são desconhecidos. Além disso, com exceção dos relatórios da U.S. EPA, nenhum dado da literatura sobre a toxicidade de ALPI para os estágios iniciais do peixe-zebra está disponível.

4.2 Análises Neurocomportamentais e de Neurotoxicidade

4.2.1 Ensaio de enrolamento da cauda (“tail coiling assay”)

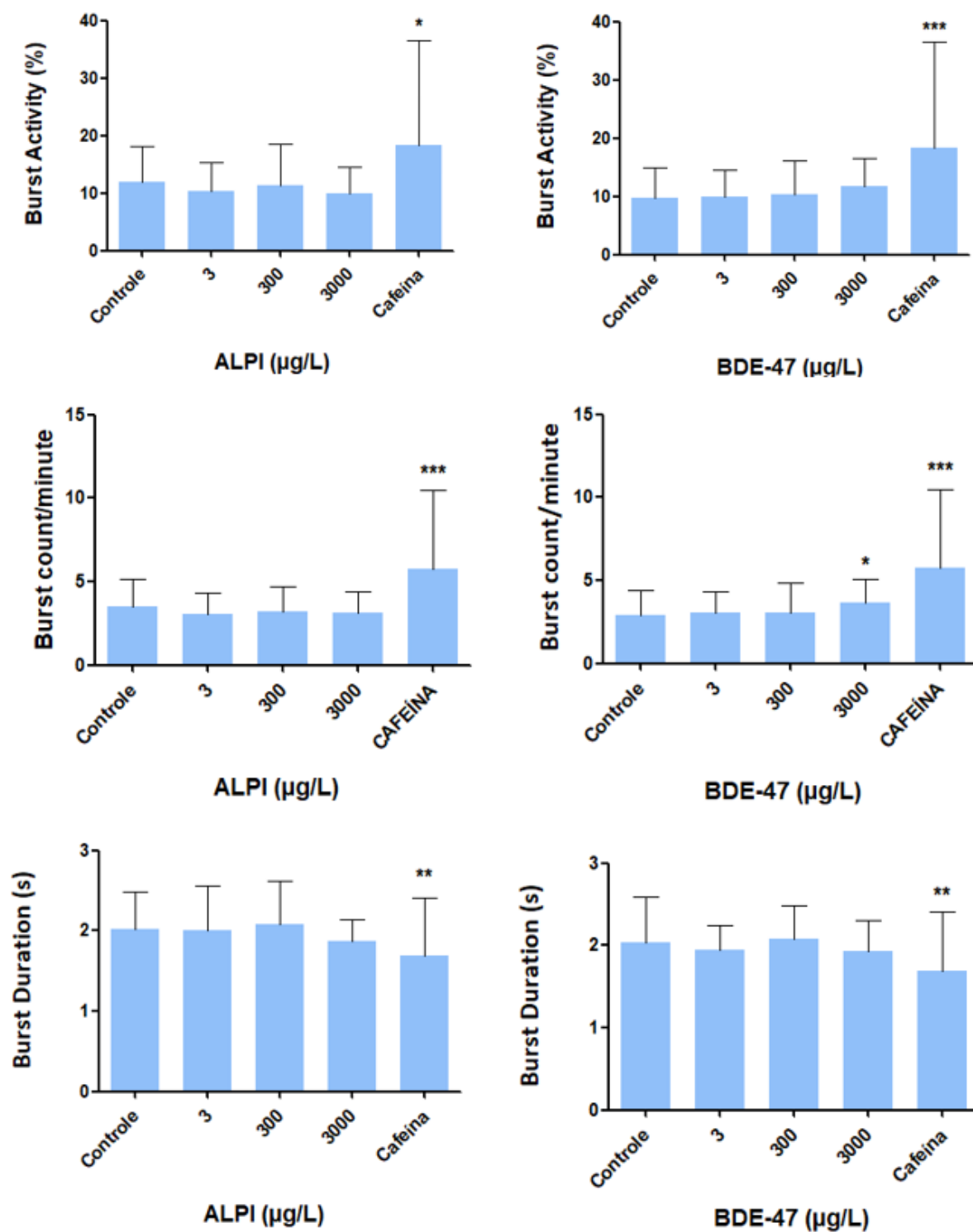
Os resultados obtidos a partir do software DanioScope (Noldus), versão 1.1 sugerem que não houve alterações comportamentais entre 26-27hpf, tanto para o

ALPI, quanto para o congênere BDE-47, com exceção do parâmetro *Burst count/minute* na concentração mais alta do BDE-47. Testes prévios haviam indicado que para concentrações mais altas do BDE-47 induziam à alterações significativas em 3 concentrações: 3µg/L; 300 µg/L e 3000µg/L. Portanto, após uma nova padronização do teste, como descrito na seção metodologia, com objetivo de diminuir as variações decorrentes do horário de gravação, e do lote de reprodução, estas 3 concentrações foram avaliadas novamente. Foi também incluído o controle positivo Cafeína (300mg/L), que proporcionou uma avaliação de efeitos com alterações significativas em todos os parâmetros.

Os resultados obtidos para os três parâmetros analisados em 26hpf estão representados na figura abaixo (Figura 14).

A análise realizada em 22hpf (dados não mostrados) não foi conclusiva. Isso por conta de uma grande variação de atividade dos organismos, decorrente do horário de análise, onde a fase claro da incubadora BOD teria seu início. A transição de escuro para claro afetou drasticamente o comportamento dos embriões.

Figura 14: Resultados apresentados para Burst Activity (%); Burst count/minute e Burst duration (s) média \pm desvio padrão (SD). N=20. Controle = controle negativo (DMSO 0,1%) para BDE-47 e água ISO-7346 para ALPI; Cafeína = Controle positivo. * Significativo em relação ao controle negativo $P < 0,05$ (Unpaired T test controle/cafeína) e (one-way ANOVA Bartlett's, complementado com o teste de Dunnet's). ** Significativo em relação ao controle negativo $P < 0,01$ (Unpaired T test controle/cafeína). *** Significativo em relação ao controle negativo $P < 0,001$ (Unpaired T test controle/cafeína).



Fonte: Autor

Estudos comportamentais utilizando embriões de zebrafish no período de 19-23hpf para avaliação do BDE-47, demonstram que a 20 μM ($\approx 10\text{mg/L}$) houve aumento significativo em sua movimentação espontânea comparado ao grupo controle (CHEN et al. 2012). Outro estudo também relata comportamento de natação deficiente em larvas após exposição ao BDE-47 (CHOU et al., 2010). Usenko et al., (2011) demonstrou que tri e tetraBDE (BDE 28 e BDE 47) tiveram maiores aumentos na movimentação espontânea em relação a congêneres com maior taxa de bromação, como o BDE-153, que mesmo na concentração mais alta testada (10mg/L) não apresentou alterações. Nas concentrações mais altas testadas, o BDE 28 e o BDE 47 mais que dobraram a taxa de movimentação espontânea (USENKO et al., 2011).

De acordo com a literatura, a alteração deste comportamento de movimentação se deve a mudanças elétricas no SNC, no entanto, devido ao estágio de desenvolvimento dos animais de teste, também pode estar relacionado à transmissão glutamatérgica (DRAPEAU et al., 2002). É postulado que os déficits neurocomportamentais associados à exposição ao PBDE podem refletir a conectividade neuronal alterada e neuroplasticidade em desenvolvimento de cérebros (KODAVANTI et al., 2010).

Com os resultados apresentados neste trabalho, apesar de um dos parâmetros apontar alterações significativas na concentração de 3000 $\mu\text{g/L}$ para o BDE-47, não é possível concluir que o composto causou alterações comportamentais devido a ausência de evidências significativas nos outros dois parâmetros analisados. As concentrações de teste para o BDE-47 utilizadas neste trabalho, foram menores que as empregadas nos estudos relatando efeitos comportamentais citados acima, porém, o objetivo principal é a comparação direta com o ALPI, que não apresentou resultados significativos em nenhum parâmetro. Mesmo em teste prévios, onde a concentração do ALPI testada foi de 30mg/L, nenhum resultado significativo foi observado (dados não mostrados).

Uma possível explicação para este comportamento do ALPI é sua característica lipofóbica. Testes de solubilidade com o ALPI em solventes orgânicos realizados por nosso grupo demonstraram incapacidade do composto em se dissolver. Levando em consideração a exposição em 26hpf, onde os embriões ainda se encontram dentro do córion, é possível que o ALPI não tenha a capacidade de penetrar esta barreira orgânica, se mantendo apenas dissolvido em água, ainda que em baixa concentração. Para complementar este teste, um ensaio de comportamento do nado realizado na fase larval do desenvolvimento está sendo realizado pelo grupo, dando continuidade na investigação e identificando possíveis efeitos.

4.2.2 Atividade da Acetilcolinesterase

Após determinação da concentração das proteínas (mg/mL) para cada amostra, utilizando a curva padrão, os resultados de absorvância foram calculados para o volume da amostra. Por se tratar de uma reação cinética, os resultados de absorvância foram obtidos com a equação:

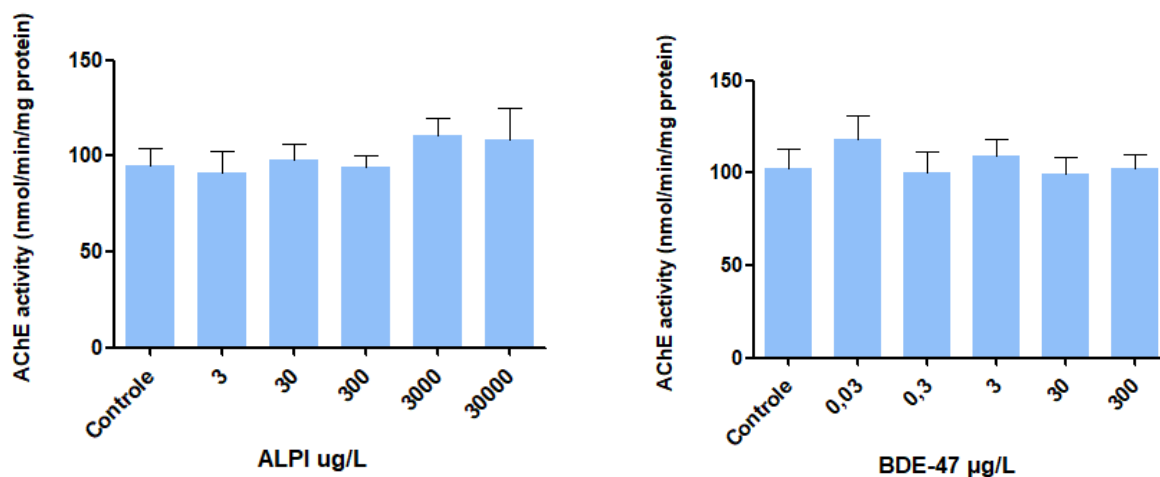
$$\frac{\Delta\text{abs}}{\Delta\text{tempo}} = \frac{\text{abs final} - \text{abs inicial}}{\text{tempo final} - \text{tempo inicial}}$$

Onde Δabs é a variação da absorvância final menos a inicial e Δtempo é a variação do tempo de leitura final menos inicial.

Os valores de absorvância (abs/min) foram transformados em molaridade (mol/L/min), ou seja, a quantidade de produto formado por minuto, (*Beer-Lambert Law*) e então a molaridade é transformada em moles presentes no volume do poço. Por fim, a atividade enzimática é corrigida por mg de proteína. O resultado final da atividade da colinesterase é expresso em nmol/min/mg proteína.

Os resultados apresentados não indicam aumento significativo na atividade da enzima tanto para o ALPI quanto para o BDE-47 (Figura 15).

Figura 15: Resultados apresentados para atividade de acetilcolinesterase (nmol/min/mg proteína) média \pm desvio padrão (SD). N=6. Controle = controle negativo (DMSO 0,01%) para BDE-47 e água ISO-7346 para ALPI. *Significativo em relação ao controle negativo para P < 0,05 (one-way ANOVA Bartlett's, complementado com o teste de Dunnett's).



Fonte: Autor

O ensaio da AChE tem o objetivo de complementar o ensaio de enrolamento da cauda. Em concentrações não letais, quando há aumento significativo na movimentação dos embriões, este efeito pode estar relacionado a uma diminuição da atividade da AChE. Quando inibida, a enzima é incapaz de hidrolizar a acetilcolina, fazendo com que o neurotransmissor se mantenha ativo por mais tempo na fenda sináptica, significando um aumento das sinapses colinérgicas, ou seja, aumento das contrações do músculo esquelético. A inibição irreversível da enzima, como acontece na exposição à organofosforados, desencadeia o rompimento funcional do sistema nervoso, podendo levar o organismo à morte (DURIEUX et al., 2011). Como não foi observado efeito na movimentação embrionária, era esperado que não houvesse alteração na atividade da enzima colinesterase.

Estudos relacionando a inibição da AChE com os PBDEs indicam que em organismos adultos de zebrafish em exposição crônica, não há inibição enzimática, sugerindo que o composto não é alvo direto da AChE (CHEN et al., 2012b). No estudo de Usenko et al., (2016), testes em diversos PBDEs demonstraram que a atividade da acetilcolinesterase não foi alterada (USENKO et al., 2016). Em relação ao ALPI, o relatório da USEPA relata moderada neurotoxicidade, utilizando ratos como modelo experimental, porém, poucas informações são relatadas, não havendo nenhum estudo envolvendo a atividade da AChE na literatura (EPA 2015).

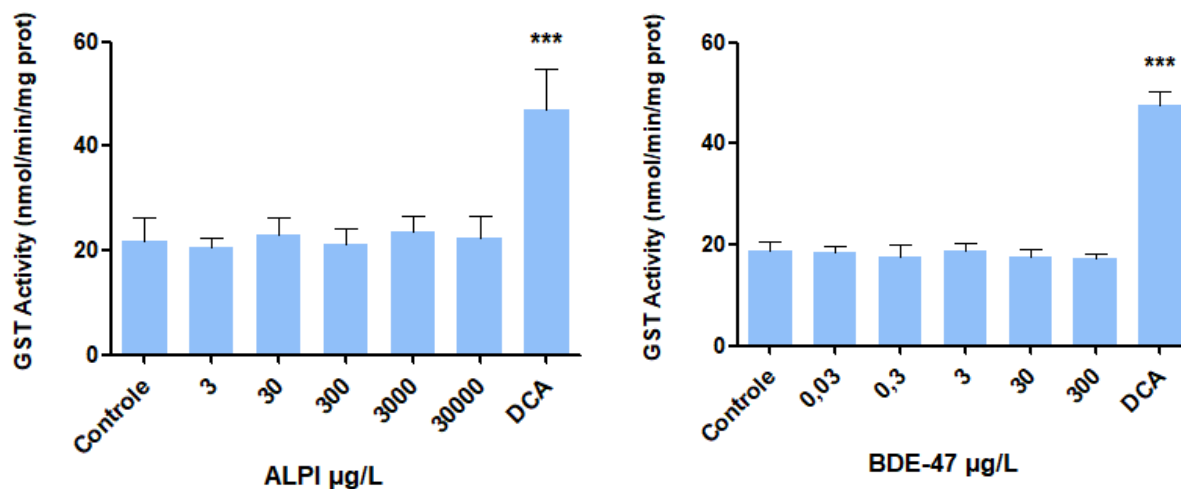
4.3 Biomarcadores de estresse oxidativo

A avaliação do estresse oxidativo foi feita analisando três diferentes parâmetros. O resultado conjunto destes biomarcadores possibilita entender os efeitos dos compostos analisados.

A quantificação da atividade tanto da GST quanto da CAT partem do mesmo princípio da avaliação de atividade da AChE, como descrito em sua seção. O cálculo é realizado a partir da *Beer-Lambert Law*, levando em consideração a concentração de proteína para cada amostra e a variação de absorvância durante o tempo de leitura (reação cinética). Para o LPO, sua quantificação também parte da *Beer-Lambert Law*, porém é uma reação de ponto final, onde a quantidade total dos analitos representa a formação de TBARS, ou seja, a conjugação do MDA (malonaldeído) com o TBA. O resultado é dividido pelo número de larvas por amostra e expresso em TBARS (pmol/larva).

A GST cataliza a conjugação de xenobióticos e alguns de seus metabólitos com a glutatona endógena, facilitando sua eliminação no organismo. Os resultados para atividade da GST observados (Figura 16) indicam que ambos retardantes de chama não alteram a atividade da enzima quando comparado ao controle, ou seja, a GST pode não estar interagindo com estes compostos no organismo.

Figura 16: Resultados apresentados para atividade da GST (nmol/min/mg de proteína) média \pm desvio padrão (SD). N=6. Controle = controle negativo (DMSO 0,01%) para BDE-47 e água ISO-7346 para ALPI; DCA = Controle positivo. *** Significativo em relação ao controle negativo P < 0,001 (Unpaired T test controle/caféina)



Fonte: Autor

O número de estudos avaliando o estresse oxidativo como um modo de ação da toxicidade induzida pelos BDEs é limitado. Um estudo realizado com embriões de zebrafish avaliando a atividade da GST para diversos congêneres de BDEs também relatou que não há mudanças na atividade da enzima. Isso pode ser explicado por conta do organismo, ainda em desenvolvimento, não ser capaz de biotransformar os BDEs, que poderiam resultar em congêneres hidroxiladas mais reativos, gerando um grande estresse ao organismo (USENKO et al., 2015).

Embora alguns congêneres hidroxilados (OH-) identificados no plasma de peixes tem origem de fontes não metabólicas, vários congêneres OH-, como OH-tetraBDEs e OH-pentaBDEs, foram encontrados originários do próprio metabolismo dos peixes (MUNSCHY et al., 2010). O crescimento hepático do zebrafish começa entre 60-72 hpf e continua até o final de seu crescimento em 5 dpf, podemos dizer que, várias enzimas biotransformadoras ainda não estão presentes de forma efetiva no organismo no momento que foi realizado o ensaio, assim, os embriões não estão

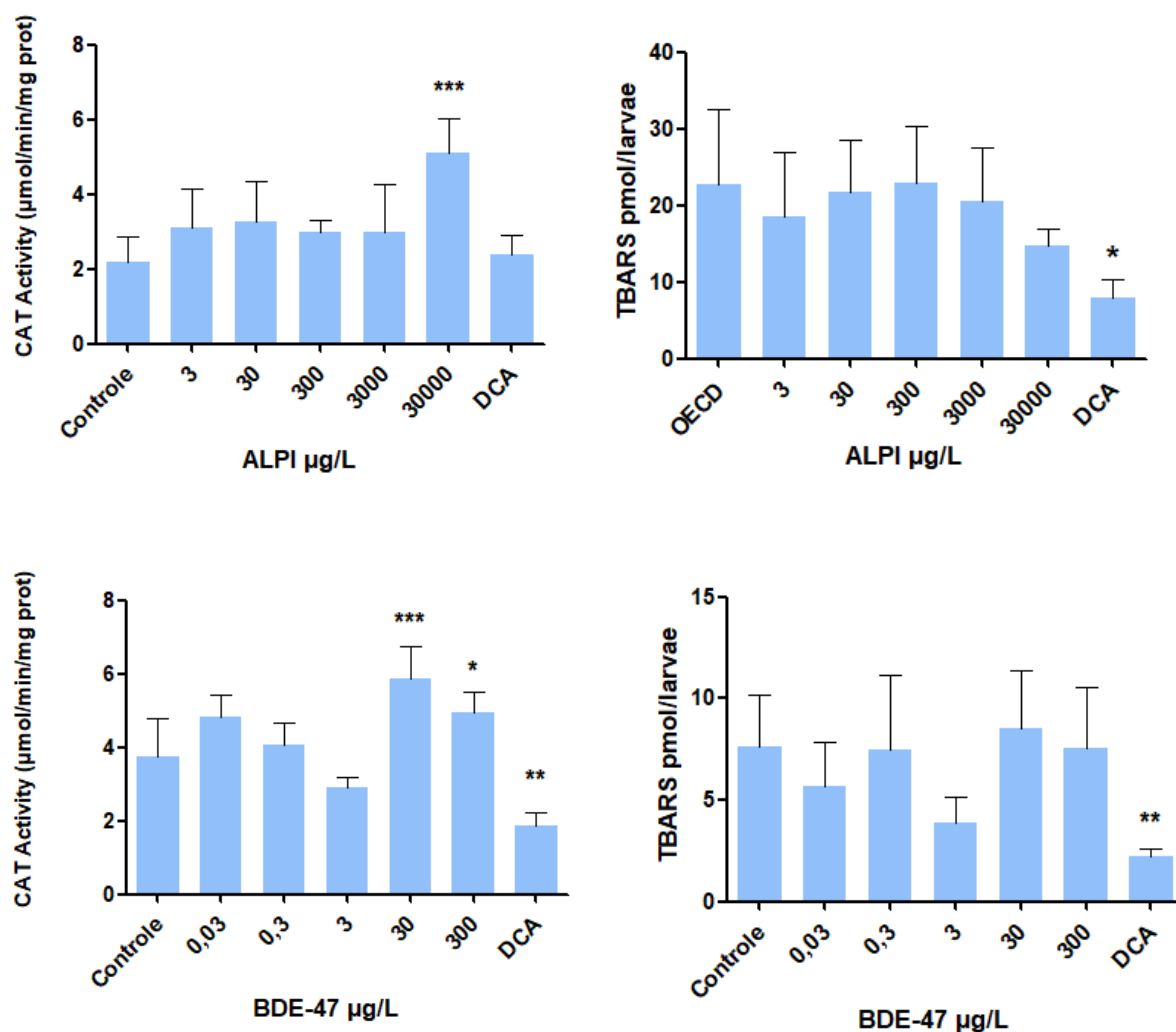
expostos a uma quantidade significativa destes metabólitos hidroxilados (KORZH et al., 2001).

É possível que o estresse oxidativo detectado em outros estudos, utilizando outros organismos e, principalmente, culturas celulares, seja devido à formação metabólica desses compostos hidroxilados, em vez da presença dos próprios compostos de origem dos PBDEs. Outra explicação seria o fato de experimentos utilizando culturas celulares em monocamada serem mais susceptíveis ao dano, como demonstra um estudo realizado por nosso grupo, onde o BDE-47 e outros congêneres apresentaram efeito genotóxico, enquanto ensaios de avaliação genotóxica utilizando o zebrafish (ensaio cometa) não relatou efeitos significativos para o BDE-47 (dados não publicados). Isso demonstra que a ausência de tecidos e falta de comunicação célula-célula podem não descrever o comportamento do composto em um organismo (PEREIRA et al., 2016).

Estudos realizados com *Fundulus heteroclitus*, uma espécie de peixe, expostos a BDE-47 à concentração mais alta de 100µg/L, 96hpf não demonstraram aumento de peroxidação lipídica nem diminuição da GSH (Glutathiona reduzida) substrato para atividade da GST (KEY et al., 2009). Em contrapartida, estudos com cultura celular de neurônio de ratos, indicaram alto nível de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e níveis de GSH afetados, porém, só na concentração mais alta testada de 41.2 µM (≈ 20mg/L) (HE et al., 2008).

Nossos resultados para LPO e CAT (Figura 17) indicam a formação de espécies reativas de oxigênio nas duas maiores concentrações do BDE-47 e na maior concentração do ALPI, considerando o aumento da atividade da catalase nessas concentrações. No entanto, não foram observadas variações significativas na peroxidação lipídica destes compostos, apenas uma diminuição de peroxidação para o controle positivo DCA.

Figura 17: Resultados apresentados para atividade da CAT e LPO média \pm desvio padrão (SD). N=6. Controle = controle negativo (DMSO 0,01%) para BDE-47 e água ISO-7346 para ALPI; DCA = Controle positivo. *Significativo em relação ao controle negativo para $P < 0,05$ (*one-way ANOVA* Bartlett's, complementado com o teste de Dunnett's) e Unpaired T test controle/caféina. *** Significativo em relação ao controle negativo para $P < 0,001$ (*one-way ANOVA* Bartlett's, complementado com o teste de Dunnett's). ** Significativo em relação ao controle negativo $P < 0,001$ (Unpaired T test controle/caféina).



Fonte: Autor

Um estudo realizado, utilizando fígado de peixe-zebra adulto para análise da atividade das enzimas CAT e SOD, relatou aumento significativo de maneira dose-dependente (MENG et al., 2020). O aumento na atividade da catalase nas doses

mais altas tanto para o BDE-47 quanto para o ALPI aqui observadas, significa um aumento na geração de peróxido de hidrogênio, porém não causando efeito no organismo, devido aos níveis normais de peroxidação lipídica.

Situações de estresse induzem a alterações metabólicas nos organismos, com o objetivo de ativar os mecanismos de defesa celular frente ao estresse. Uma das primeiras respostas bioquímicas das células é o aumento da produção das chamadas *Heat Shock Proteins* (HSP), assim chamadas por terem sido inicialmente identificadas como proteínas induzidas pelo estresse térmico (RITOSSA, 1962). Atualmente, sabe-se que as proteínas HSP são expressas também sob outras situações estressoras além de altas temperaturas, como o estresse oxidativo e, possuem um papel fundamental na reorganização e substituição de proteínas que sofreram danos induzidos por diferentes condições, além de prevenir as vias da apoptose (CASTRO et al., 2013; GUPTA et al., 2007; MOSSER et al. 1997). Assim, em situações em que as células estão danificadas, mas o dano não é significativo o suficiente para induzir a apoptose, então a TRAP1, uma proteína HSP, é usada para estabilizar as proteínas na célula e evitar sua degradação, até que as proteínas sejam reparadas. A TRAP1 tem uma interação oposta com HSP70 (envolvida na sinalização apoptótica). Assim, aparentemente, a TRAP1 pode estar protegendo a célula em estresse da indução de apoptose (PROCTOR; LORIMER, 2011; USENKO et al., 2015). Dentro deste contexto, podemos sugerir que a geração de peróxido de hidrogênio aqui observada nas maiores concentrações dos compostos em estudo pode não ter sido suficiente para induzir aos efeitos esperados devido à ativação de sistemas de defesa, como proteínas HSP. De fato, a exposição aos retardantes de chama aqui estudados, em especial o BDE-47 induz a um desbalanço energético, como vem sendo mostrado em outro estudo conduzido pelo nosso grupo de pesquisa (RIALTO, T. Tese de doutorado em andamento). Os resultados preliminares mostram que a exposição ao ALPI induz a um aumento da mobilização de proteínas e redução da utilização de lipídeos, enquanto a exposição ao BDE induz a redução drástica da energia alocada como carboidratos e aumento na mobilização de proteínas (dados não mostrados). Embora esses dados sejam ainda preliminares, demonstram que o estresse causado pela exposição aos retardantes de chama induzem a alterações metabólicas, como a alocação de energia.

Carboidratos e lipídios representam as principais fontes de energia e são rapidamente mobilizados para suprimir demandas energéticas (De COEN; JANSSEN, 1997; SMOLDERS et al., 2003), enquanto proteínas são mobilizadas apenas em condições severas (MCKEE; KNOWLES, 1986). Assim, podemos supor que a geração de peróxido de hidrogênio observada pode não ser suficiente para induzir a efeitos detectáveis no estresse oxidativo, mas é capaz de alterar o balanço energético, com aumento na mobilização de proteínas, possivelmente relacionada à expressão de proteínas HSP.

Adicionalmente, ao compararmos as concentrações dos retardantes de chama, apenas a mais alta do ALPI teve efeito significativo na indução da atividade da catalase, sendo ela 100 vezes maior que a concentração mais alta testada para o BDE-47. O ALPI é descrito como um composto não bioacumulativo, ou seja, a tendência é que a concentração de ALPI não aumente no organismo mesmo em exposição crônica, sendo este um dos principais problemas envolvendo a toxicidade dos BDEs em compartimentos ambientais. Desta forma, considerando que o BDE-47 é um composto bioacumulativo, a capacidade do organismo em compensar a sobrecarga de peróxido de hidrogênio pode ser perdida ou reduzida ao longo do tempo, devido à bioacumulação do composto, fazendo com que ocorra a manifestação do efeito a médio e longo prazo.

Além disso, os BDEs possuem a capacidade de se converterem para congêneres hidroxilados, ou sofrerem debromação, se tornando mais tóxicos (US EPA, 2014). Não há informações sobre a formação de metabólitos tóxicos provenientes da degradação do ALPI, porém outros testes devem ser realizados para o entendimento da toxicidade deste composto.

Ao observarmos o controle positivo DCA, fica claro um grande aumento na atividade da GST, o que significa que a enzima está metabolizando uma grande quantidade de macromoléculas, o que era esperado, tendo em vista que este composto induz estresse oxidativo (LI et al., 2003). Na peroxidação lipídica, os níveis de atividade ficaram significativamente abaixo dos controles. A diminuição no índice de peroxidação lipídica observada no controle positivo ocorre por se tratar de uma dose citotóxica, gerando apoptose. A apoptose libera inúmeros componentes

celulares que então permanecem expostos à reação ao TBARS. O teste TBARS é intrinsecamente inespecífico para o malonaldeído (MDA); materiais não relacionados a lipídios, bem como produtos de decomposição derivados de peróxidos graxos, também são TBARS positivos. Assim, é mais provável que o TBARS reaja com moléculas que não sejam o malonaldeído, devido à grande quantidade de substâncias presentes, levando a não detecção do complexo TBARS-MDA, indicador de peroxidação lipídica (JANERO, 1990).

5. Conclusão

Os parâmetros utilizados neste trabalho buscaram avaliar diferentes efeitos causados por dois retardantes de chama a embriões de zebrafish em sua fase inicial do desenvolvimento, desde toxicidade aguda, comportamento, até indicadores de alterações precoces, com os biomarcadores. Considerando os resultados obtidos, podemos concluir que:

- O retardante de chama alternativo ALPI se mostrou mais seguro em relação à indução de efeitos detectáveis, enquanto o BDE-47, induziu alterações significativas no teste de toxicidade aguda (FET test).

- Ambos os compostos induziram a um aumento da geração de peróxido de hidrogênio, que não foi suficiente para induzir a um efeito detectável. No entanto, considerando que o BDE-47 é bioacumulativo, a capacidade dos organismos em compensar o estresse devido à geração de uma espécie reativa de oxigênio pode ser perdida ou reduzida, podendo impactar os organismos em casos de exposições crônicas.

Considerações finais

A partir dos resultados aqui demonstrados e dos dados da literatura publicados até o momento, podemos concluir que o ALPI se mantém um promissor substituto, sendo este trabalho uma contribuição para a investigação da toxicidade deste retardante alternativo, assim como para incentivar a avaliação dos HFFRs e retardantes de chama alternativos em geral, substituindo os PBDEs e outras classes que já são descritas como contaminantes emergentes e banidas em diversos países.

Esperamos também que este trabalho enfatize a importância da utilização dos retardantes de chama e que novas discussões, assim como regulamentações, garantam a aplicabilidade e a qualidade na utilização destes compostos.

6. Proposta para trabalhos futuros

6. PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS

Para elucidar outros mecanismos tóxicos que podem ser desencadeados a partir da contaminação do ALPI, seria interessante a realização de ensaios de comportamento do nado, pois, a larva estaria exposta diretamente ao composto, não havendo a barreira do córion. Além disso, mais dados sobre sua capacidade de bioacumulação, persistência e concentrações em compartimentos ambientais seriam de grande relevância para o entendimento do impacto que o composto pode causar.

Outros ensaios como fotodegradação e degradações enzimáticas conseguiriam esclarecer se há possíveis metabólitos com alto potencial tóxico que podem ser gerados a partir destes processos. A utilização de outros organismos modelo, assim como organismos adultos em exposição crônica também seriam de grande valor para essa investigação.

7. Bibliografia

7. BIBLIOGRAFIA

ABE, F. R., DE OLIVEIRA, A. Á. S., MARINO, R. V., RIALTO, T. C. R., OLIVEIRA, D. P., & DORTA, D. J. A comparison of developmental toxicity of brominated and halogen-free flame retardant on zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 208, 2021.

AHRENS, M., & EVARTS, B. Fire Loss in the United States During 2020. National Fire Protection Association, 2021. disponível em <<https://www.nfpa.org/News-and-Research/Data-research-and-tools/US-Fire-Problem/Fire-loss-in-the-United-States>>.

ALAEI, M., ARIAS, P., SJÖDIN, A., & BERGMAN, Å. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environment International*, v. 29, n. 6, p. 683–689, 2003.

BALDUCCI, C., PERILLI, M., ROMAGNOLI, P., & CECINATO, A. New developments on emerging organic pollutants in the atmosphere. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 19, n. 6, p. 1875–1884, 2012.

BARCELÓ, D., PETROVIC, M., ALLARD, B. *Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste Occurrence, Analysis and Effects* (book), 2008.)

BARONE S JR, DAS KP, LASSITER TL, WHITE LD. Vulnerable processes of nervous system development: a review of markers and methods. *Neurotoxicology*, v. 21 n.1-2 p. 15-36, 2000.

BETTS, K. S. Formulating green flame retardants. *Environmental science & technology*, v. 41, n. 21, p. 7201–7202, 2007.

BIRNBAUM, L. S., & STASKAL, D. F. Brominated flame retardants: Cause for concern? *Environmental Health Perspectives*, v. 112, n. 1, p. 9–17, 2004.

BIRNBAUM, L. S., STASKAL, D. F., & DILIBERTO, J. J. Health effects of polybrominated dibenzo-p-dioxins (PBDDs) and dibenzofurans (PBDFs). *Environment International*, v. 29 n. 6, p. 855–860, 2003.

BOTARO, D., & TORRES, J. P. M.. Difenil Éteres Polibromados (Pbdes) – Novos Poluentes, Antigos Desafios. *Oecologia Brasiliensis*, v. 11, n. 2, p. 167–178, 2007.

BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248-254, 1976.

BRAUNBECK, T., & LAMMER, E. OECD Background on fish embryo toxicity testing VOLUME I-III. German Federal Environment Agency, 203, 1–298, 2006.

CASTRO S. V., LOBO C. H., DE FIGUEIREDO J. R., RODRIGUES A. R. Proteínas de choque térmico Hsp 70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.7, n.4, p.261-271, 2013.

CHAN, W. K., & CHAN, K. M. Disruption of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in zebrafish embryo-larvae following waterborne exposure to BDE-47, TBBPA and BPA. *Aquatic Toxicology*, v. 108, p. 106–111, 2012.

CHEN L, YU K, HUANG C, YU L, ZHU B, LAM PK, LAM JC, ZHOU B. Prenatal transfer of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) results in developmental neurotoxicity in zebrafish larvae. *Environmental Science & Technology*, v. 46, n. 17, p. 9727–9734, 2012.

CHEN, X., HUANG, C., WANG, X., CHEN, J., BAI, C., CHEN, Y., CHEN, X., DONG, Q., & YANG, D. BDE-47 disrupts axonal growth and motor behavior in developing zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 120–121, 35–44, 2012.

CHOU, C. T., HSIAO, Y. C., KO, F. C., CHENG, J. O., CHENG, Y. M., & CHEN, T. H. Chronic exposure of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) alters locomotion behavior in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, v. 98, n. 4, p. 388–395, 2010.

CLAIBORNE A. Catalase activity. In: *CRC handbook of methods in oxygen radical research*, Ed. R.A. Greenwald, p. 283-284, 1985.

DE COEN, W. M.; JANSSEN, C. R. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. v.6, p.43–55, 1997.

DE OLIVEIRA, A. A. S., BRIGANTE, T. A. V., & OLIVEIRA, D. P. Tail coiling assay in zebrafish (*Danio rerio*) embryos: Stage of development, promising positive control candidates, and selection of an appropriate organic solvent for screening of developmental neurotoxicity (DNT). *Water*, v. 13, n. 2, p. 199, 2021.

DÍAZ-JARAMILLO, M., MIGLIORANZA, K. S. B., GONZALEZ, M., BARÓN, E., MONSERRAT, J. M., ELJARRAT, E., & BARCELÓ, D. Uptake, metabolism and sub-lethal effects of BDE-47 in two estuarine invertebrates with different trophic positions. *Environmental Pollution*, v. 213, p. 608–617, 2016.

DIETZ, R., RIGÉT, F. F., SONNE, C., LETCHER, R. J., BACKUS, S., BORN, E. W., KIRKEGAARD, M., & MUIR, D. C. G. Age and seasonal variability of polybrominated diphenyl ethers in free-ranging East Greenland polar bears (*Ursus maritimus*). *Environmental Pollution*, v. 146, n. 1, p. 166–173, 2007.

DOMINGUES I., GRAVATO C. Oxidative Stress Assessment in Zebrafish Larvae. *Teratogenicity Testing. Protocol*, v. 1797, p. 477-486, 2018.

DRAPEAU, P., SAINT-AMANT, L., BUSS, R. R., CHONG, M., MCDEARMID, J. R., & BRUSTEIN, E. Development of the locomotor network in zebrafish. *Progress in Neurobiology*, v. 68, n. 2, p. 85–111, 2002.

DURIEUX, E. D. H., FARVER, T. B., FITZGERALD, P. S., EDER, K. J., & OSTRACH, D. J. Natural factors to consider when using acetylcholinesterase activity as neurotoxicity biomarker in Young-Of-Year striped bass (*Morone saxatilis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 37, n. 1, p. 21–29, 2011.

ELLMAN G. L., COURTNEY K. D., ANDRES V., FEATHER-STONE R. M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

ERIKSSON, P., FISCHER, C., & FREDRIKSSON, A. Polybrominated diphenyl ethers, a group of brominated flame retardants, can interact with polychlorinated biphenyls in enhancing developmental neurobehavioral defects. *Toxicological Sciences*, v. 94, n. 2, p. 302–309, 2006.

EUR. Risk assessment of diphenyl ether, pentabromo derivative (pentabromodiphenyl ether), European Union Risk Assessment Report, 2001. Disponível em: < <https://echa.europa.eu/documents/10162/781ee1e9-6c90-467e-998b-8910ca2793e5>>.

FISCHER, A., WOLMAN, M., GRANATO, M., PARSONS, M., MCCALLION, A. S., PROESCHER, J., & ENGLISH, E. Carbamate nerve agent prophylactics exhibit distinct toxicological effects in the zebrafish embryo model. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 50, p. 1–10, 2015.

GAVRILESCU, M., DEMNEROVÁ, K. et al. Emerging pollutants in the environment: Present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology*, v. 32, n. 1, p. 147–156, 2015.

GRAND VIEW RESEARCH. Flame Retardant Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Halogenated, Non-halogenated), By Application (Polyolefin, Epoxy Resins), By End Use (Electrical & Electronics, Construction), And Segment Forecasts, 2021 - 2028. Grand View Research, 2021. Disponível em <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/flame-retardant-market>>.

GRAVATO C., ABE F.R., DE OLIVEIRA D.P., SOARES A.M.V.M., DOMINGUES I. Acetylcholinesterase (AChE) Activity in Embryos of Zebrafish. *Toxicity Assessment. Methods in Molecular Biology*, v. 2240, p. 119-124, 2021.

GUPTA S. C., SIDDIQUE H. R., MATHUR N., VISHWAKARMA A. L., MISHARA R. K., SAXENA D. K., CHOWDHURI D. K. Induction of Hsp70, alteration in oxidative stress markers and apoptosis against dichlorvos exposure in transgenic *Drosophila melanogaster*: modulation by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1770, n. 9, p. 1382-1394, 2007.

HAN, X. B., LEI, E. N. Y., LAM, M. H. W., & WU, R. S. S. A whole life cycle assessment on effects of waterborne PBDEs on gene expression profile along the brain-pituitary-gonad axis and in the liver of zebrafish. *Marine Pollution Bulletin*, v. 63 n.5–12, p. 160–165, 2011.

HARJU, M., HAMERS, T., KAMSTRA, J.H., SONNEVELD, E., BOON, J.P., TYSKLIND, M., ANDERSSON, P.L. Quantitative structure-activity relationship modeling on in vitro endocrine effects and metabolic stability involving 26 selected

brominated flame retardants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 26, n. 4, p. 816–826, 2007.

HAVERROTH, G. M. B., WELANG, C., MOCELIN, R. N., POSTAY, D., BERTONCELLO, K. T., FRANSCESCON, F., ROSEMBERG, D. B., DAL MAGRO, J., & DALLA CORTE, C. L. Copper acutely impairs behavioral function and muscle acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 122, p. 440–447, 2015.

HE, P., HE, W., WANG, A., XIA, T., XU, B., ZHANG, M., & CHEN, X. PBDE-47-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis in primary cultured rat hippocampal neurons. *NeuroToxicology*, v. 29, n. 1, p. 124–129, 2008.

HELLSTRÖM, T. Brominated Flame Retardants (PBDE and PBB) in Sludge – a Problem? The Swedish Water and Wastewater Association, 2000.

HENDRIKS, H. S., MEIJER, M., MUILWIJK, M., VAN DEN BERG, M., & WESTERINK, R. H. S. A comparison of the in vitro cyto- and neurotoxicity of brominated and halogen-free flame retardants: Prioritization in search for safe(r) alternatives. *Archives of Toxicology*, v. 88, n. 4, p. 857–869, 2014.

HILL, A.J., BELLO, S.M., PRASCH, A.L., PETERSON, R.E., HEIDEMAN, W. Water permeability and TCDD-induced edema in zebrafish early-life stages. *Toxicological Sciences*, v. 78, p. 78–87, 2003.

HOOPER, K., & MCDONALD, T. A. The PBDEs: An emerging environmental challenge and another reason for breast-milk monitoring programs. *Environmental Health Perspectives*, v. 108, n. 5, p. 387–392, 2000.

IBIGBAMI, O. A. Occurrence , Levels and Spatial Distribution of Polybrominated Diphenyl Ethers : Case Study of Elemi River in Ado-Ekiti, Nigeria. *Pakistan Journal of Analytical and Environmental Chemistry*, v. 22, n. 1, p. 264–272, 2021.

JANERO D. R., Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 9, p. 515-540, 1990.

JEMEC, A., DROBNE, D., TIŠLER, T., & SEPČIĆ, K. Biochemical biomarkers in environmental studies-lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 17, n. 3, p. 571–581, 2010.

KEY, P. B., HOGUET, J., CHUNG, K. W., VENTURELLA, J. J., PENNINGTON, P. L., & FULTON, M. H. Lethal and sublethal effects of simvastatin, irgarol, and PBDE-47 on the estuarine fish, *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Environmental Science and Health*, v. 44, n. 4, p. 379–382, 2009.

KIMMEL, C. B., BALLARD, W. W., KIMMEL, S. R., ULLMANN, B., & SCHILLING, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, v. 203, n. 3, p. 253–310, 1995.

- KODAVANTI, P. R. S., & CURRAS-COLLAZO, M. C. Neuroendocrine actions of organohalogenes: Thyroid hormones, arginine vasopressin, and neuroplasticity. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 31, n. 4, p. 479–496, 2010.
- KORZH S., EMELYANOV A., KORZH V. Developmental analysis of ceruloplasmin gene and liver formation in zebrafish. *Mechanisms of Development*. v. 103, n. 1-2, p. 137-139, 2001.
- L.R. VIEIRA, C. GRAVATO, A.M.V.M. SOARES, F. MORGADO, L. GUILHERMINO. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour, *Chemosphere*, v. 76, n. 10, p. 1416-1427, 2009.
- LEMA, S.C., SCHULTZ, I.R., SCHOLZ, N.L., INCARDONA, J.P., SWANSON, P. Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,2',4,4' - tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). *Aquatic Toxicology*, v. 82, n. 4, p. 296–307, 2007.
- LI W., YIN D., ZHOU Y., HU S., WANG L. 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 56, n. 2, p. 251-255, 2003.
- LIU, H., TANG, S., ZHENG, X., ZHU, Y., MA, Z., LIU, C., HECKER, M., SAUNDERS, D.M.V., GIESY, J.P., ZHANG, X., YU, H. Bioaccumulation, biotransformation, and toxicity of BDE-47, 6-OH-BDE-47, and 6-MeO-BDE-47 in early life-stages of Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology*, v. 49, p. 3, n. 1823–1833, 2015.
- MCKEE, M.J., KNOWLES, C.O. Protein, nucleic acid and adenylate levels in *Daphnia magna* during chronic exposure to chlordecone. *Environmental Pollution*, v. 42, p. 335-351, 1986.
- MENG S., CHEN X., GYIMAH E., XU H., CHEN J. Hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish following sub-chronic exposure to BDE-47 and BDE-153. *Environmental Toxicology*. v. 35, n. 11, p. 1202-1211, 2020.
- MODY, G. G., & VEGF, M. Zebrafish: From disease modeling to drug discovery Amy L Rubinstein. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, v. 6, n. 2, p. 218–223, 2003.
- MOSSER D. D., CARON A. W., BOURGET L., DENIS-LAROSE C., MASSIE B. Role of the human heat shock protein HSP70 in protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*. v. 17, p. 5317-5327, 1997.
- MUNSCHY C., HÉAS-MOISAN K., TIXIER C., PACEPAVICIUS G., ALAEE M. Dietary exposure of juvenile common sole (*Solea solea* L.) to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): Part 2. Formation, bioaccumulation and elimination of hydroxylated metabolites. *Environmental Pollution*. v. 158, p. 3527-3533, 2010.
- NAGEL, R., DarT: the embryo test with the Zebrafish *Danio rerio* – a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex*, v. 19, p. 38–48, 2002.
- OECD, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, 2013.

OGUNGBEMI, A. O., TEIXIDO, E., MASSEI, R., SCHOLZ, S., & KÜSTER, E. Optimization of the spontaneous tail coiling test for fast assessment of neurotoxic effects in the zebrafish embryo using an automated workflow in KNIME®. *Neurotoxicology and Teratology*, 81 106918, 2020.

OTITOJU, O., & ONWURAH, I. N. E. Glutathione S-transferase (GST) activity as a biomarker in ecological risk assessment of pesticide contaminated environment. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 12, p. 1455–1459, 2007.

PABST, M. J., HABIG, W. H., & JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 249, p. 22, n. 7140–7148, 1974.

PARSONS, A., LANGE, A., HUTCHINSON, T.H., MIYAGAWA, S., IGUCHI, T., KUDOH, T., TYLER, C.R. Molecular mechanisms and tissue targets of brominated flame retardants, BDE-47 and TBBPA, in embryo-larval life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, v. 209, p. 99–112, 2019.

PEREIRA C.L., DE SOUZA A.O., MEIRELES G., BERNARDES M.F. , TASSO M., BRUNO V., DORTA D.J., DE OLIVEIRA D.P. Comparative Study of Genotoxicity Induced by Six Different PBDEs. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 119, p. 396–404, 2016.

PESTANA, C. R., BORGES, K. B., DA FONSECA, P., & DE OLIVEIRA, D. P. Risco ambiental da aplicação de éteres de difenilas polibromadas como retardantes de chama. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 21, n. 2, p. 41–48, 2008.

PROCTOR C.J., LORIMER A.J. Modelling the Role of the Hsp70/Hsp90 System in the Maintenance of Protein Homeostasis. *PLoS One*. v. 6, n. 7. p. 22038, 2011.

R.P. BIRD, H.H. DRAPER, Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination, *Methods in Enzymology*, Academic Press, v. 105, p. 299-305, 1984.

RASOOLY, R. S., HENKEN, D., FREEMAN, N., TOMPKINS, L., BADMAN, D., BRIGGS, J., & HEWITT, A. T. Genetic and Genomic Tools for Zebrafish Research: The NIH Zebrafish Initiative. *Developmental Dynamics*, v. 228, n. 3, p. 490–496, 2003.

RITOSSA F. M. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*. v. 18, p. 571-573, 1962.

SAINT-AMANT, L., & DRAPEAU, P. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *Journal of Neurobiology*, v. 37, n. 4, p. 622–632, 1998.

SANTOMAURO, A. C. Retardantes à Chama: Surgem normas oficiais para exigir Aditivos mas ainda há muitos itens desprotegidos. *Plástico Moderno*, 18 de outubro 2016. Disponível em: <<https://www.plastico.com.br/retardantes-de-chama-surgem-normas-oficiais-para-exigir-aditivos-mas-ainda-ha-muitos-itens-desprotegidos/>>

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, n. 14, p. 1723–1729, 2003.

SELDERSLAGHS, I. W. T., HOOYBERGHS, J., DE COEN, W., & WITTERS, H. E. Locomotor activity in zebrafish embryos: A new method to assess developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 32, n. 4, p. 460–471, 2010.

SHUGART, L.R., MCCARTHY, J.F., HALBROOK R.S. Biological Markers of Environmental and Ecological Contamination: An Overview. *Risk Analysis*, v. 12, n. 3, 1992.

SMOLDERS, R., BOECK, G., BLUST, R. Changes in cellular energy budget as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. v. 22, n. 4, p. 890-899, 2003.

TOMS, L. M. L., HARDEN, F. A., SYMONS, R. K., BURNISTON, D., FÜRST, P., & MÜLLER, J. F. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in human milk from Australia. *Chemosphere*, v. 68, n.5, p. 797–803 2007.

TRUONG, L., HARPER, S. L., & TANGUAY, R. L. Evaluation of embryotoxicity using the zebrafish model. *Methods in molecular biology*, v. 691, n. 8, p. 1–8, 2011.

UNEP, Recommendations of the persistent organic pollutants review committee of the Stockholm Convention to amend annexes A, B or C of the convention. United Nations Environment Programme, Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, UNEP/POPS/ COP.4/17. 2009.

US EPA. An Alternatives Assessment For The Flame Retardant Decabromodiphenyl Ether (DecaBDE) (Final report). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2014. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites>>.

US EPA. Contaminants of Emerging Concern including Pharmaceuticals and Personal Care Products. Water Quality Criteria. Washington, D.C.: U.S. Environmental Protection Agency (EPA), 2019.

US EPA. Flame Retardants in pressed Circuit Boards. Final Report. EPA/744-R-15-001. Environmental Protection Agency (EPA), 2015. disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/pcb_final_report.pdf>.

US EPA. Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) Project Plan, Office of Research and Development, United States Environmental Protection Agency, 2006.

USENKO C. Y., ABEL E. L., KUDELA M., JANISE A., BRUCE E.D. Comparison of PBDE congeners as inducers of oxidative stress in zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 34, n. 5, p. 1154-1160, 2015.

USENKO, C. Y., ABEL, E. L., HOPKINS, A., MARTINEZ, G., TIJERINA, J., KUDELA, M., NORRIS, N., JOUDEH, L., & BRUCE, E. D. Evaluation of common use Brominated Flame Retardant (BFR) toxicity using a Zebrafish embryo model. *Toxics*, v. 4, n. 3, p. 21, 2016.

- USENKO, C. Y., ROBINSON, E. M., USENKO, S., BROOKS, B. W., & BRUCE, E. D. PBDE developmental effects on embryonic zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 30, n. 8, p. 1865–1872, 2011.
- VALAVANIDIS, A., VLAHOGIANNI, T., DASSENAKIS, M., & SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 64, n. 2, p. 178–189, 2006.
- VAN DER OOST, R., BEYER, J., & VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2016.
- VAN DER VEEN, I., & DE BOER, J. Phosphorus flame retardants: Properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis. *Chemosphere*, v. 88, n. 10, p. 1119–1153, 2012.
- VLIET, S. M., HO, T. C., & VOLZ, D. C. Behavioral screening of the LOPAC1280 library in zebrafish embryos. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 329, p. 241–248, 2017.
- WAAIJERS S. L. et al. Persistence, bioaccumulation, and toxicity of halogen-free flame retardants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 222, p. 1-71, 2013.
- WAAIJERS, S. L., BLEYENBERG, T. E., DITS, A., SCHOORL, M., SCHÜTT, J., KOOLS, S. A. E., DE VOOGT, P., ADMIRAAL, W., PARSONS, J. R., & KRAAK, M. H. S. Daphnid life cycle responses to new generation flame retardants. *Environmental Science and Technology*, v. 47, n. 23, p. 13798–13803, 2013.
- WAAIJERS, S. L., HARTMANN, J., SOETER, A. M., HELMUS, R., KOOLS, S. A. E., DE VOOGT, P., ADMIRAAL, W., PARSONS, J. R., & KRAAK, M. H. S. Toxicity of new generation flame retardants to *Daphnia magna*. *Science of the Total Environment*, p. 463–464, 1042–1048, 2013.
- WATANABE, I., & TATSUKAWA, R. Formation of brominated dibenzofurans from the photolysis of flame retardant decabromobiphenyl ether in hexane solution by UV and sun light. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 39, n. 6, p. 953–959, 1987.
- WIT, C. A. An overview of brominated flame retardants in the environment. In *Chemosphere* v. 46, n. 5, p. 583–624 2002.
- XIE, Z., LU, G., & QI, P. Effects of BDE-209 and its mixtures with BDE-47 and BDE-99 on multiple biomarkers in *Carassius auratus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 38, n. 2, p. 554–561, 2014.
- XING, X., KANG, J., QIU, J., ZHONG, X., SHI, X., ZHOU, B., WEI, Y. Waterborne exposure to low concentrations of BDE-47 impedes early vascular development in zebrafish embryos/larvae. *Aquat. Toxicol.* 203, 19–27, 2018.
- ZEZZA, D., TAIT, S., SALDA, L.D., AMORENA, M., MEROLA, C., PERUGINI, M. Toxicological, gene expression and histopathological evaluations of environmentally

realistic concentrations of polybrominated diphenyl ethers PBDE- 47, PBDE-99 and PBDE-209 on zebrafish embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 183, 109566, 2019.

ZINDLER, F., BEEDGEN, F., & BRAUNBECK, T. Time-course of coiling activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to ethanol as an endpoint for developmental neurotoxicity (DNT) – Hidden potential and underestimated challenges. *Chemosphere*, v. 235, p. 12–20, 2019.

ZIRGER, J. M., BEATTIE, C. E., MCKAY, D. B., & BOYD, R. T. Cloning and expression of zebrafish neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Gene Expression Patterns*, v. 3, n. 6, p. 747–754, 2003.

ANEXO I – Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO


Certificamos a proposta intitulada "Avaliação de múltiplos parâmetros em Zebrafish (*Danio rerio*) para a avaliação da toxicidade de retardantes de chama: Alterações no desenvolvimento, indução de estresse oxidativo e alterações neurocomportamentais", registrada sob nº 19.1.845.60.4, sob a responsabilidade de Renan Vieira Marino e Danielle Palma de Oliveira, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada na reunião de 01/10/2019 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Colaboradores: Flavia Renata Abe

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	30/11/2019 a 03/12/2021
Espécie/Linhagem/Raça	Peixe <i>Danio rerio</i>
Nº de animais	6570
Peso/Idade	Indiferente/ Embrião (até 96 horas pós-fertilização)
Sexo	Indiferente
Origem	Biotério de Toxicologia Ambiental

Ribeirão Preto, 02 de outubro de 2019.


Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Coordenadora da CEUA-FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre - CEP 14040-903 - Ribeirão Preto - SP
Comissão de Ética no Uso de Animais - ceua@fcrp.usp.br
Fone: (16) 3315-8559 - Fax: (16) 33152-4892

