UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE (PPG-CAPS)

Thais Oliveira de Lucena Leoncio

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO RETARDANTE DE CHAMA DIETILFOSFINATO DE ALUMÍNIO

NITERÓI

2021

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO RETARDANTE DE CHAMA DIETILFOSFINATO DE ALUMÍNIO

Thais Oliveira de Lucena Leoncio

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde Universidade Federal Fluminense, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Dra. Elisa Raquel Anastácio Ferraz Avelino
Coorientadora: Dra. Andréia da Silva Fernandes Campos

NITERÓI
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica automática - SDC/BFF
Gerada com informações fornecidas pelo autor

L582a Leoncio, Thais Oliveira de Lucena
Avaliação da toxicidade do retardante de chama dietilfosfinato de alumínio / Thais Oliveira de Lucena Leoncio ; Elisa Raquel Anastácio Ferraz Avelino, orientadora ; Andréia da Silva Fernandes Campos, coorientadora. Niterói, 2021.
62 f.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2021.

DOI: http://dx.doi.org/10.22409/PPG-CAPS.2021.m.13208260750

1. Dietilfosfinato de alumínio. 2. Retardantes de chama. 3. Contaminantes emergentes. 4. Genotoxicidade. 5. Produção intelectual. I. Avelino, Elisa Raquel Anastácio Ferraz, orientadora. II. Campos, Andréia da Silva Fernandes, coorientadora. III. Universidade Federal Fluminense. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD -

Bibliotecário responsável: Debora do Nascimento - CRB7/6368

THAIS OLIVEIRA DE LUCENA LEONCIO

“Avaliação da toxicidade do retardante de chama dietilfosfinato de alumínio”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde Universidade Federal Fluminense, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Aprovado em: 19/11/2021

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Elisa Raquel Anastácio Ferraz Avelino
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dra. Farah Maria Drumond Chequer Baldoni
Universidade Federal de São João del-Rei

Prof. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira
Universidade Federal de Goiás

NITERÓI

2021

DEDICATÓRIA

Dedico com carinho esse trabalho aqueles que tocam a minha vida de maneira singular: a Deus, que dá sentido a minha existência e para o qual eu desejo viver, ao meu amado esposo Gabriel Leoncio com quem partilho com doçura a caminhada até Cristo, e aos meus amados pais Marinalva Lucena e José Josimar Lucena que sempre foram fonte de apoio e incentivo para a minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus por sua imerecida graça que permitiu-me viver essa experiência.

Ao meu esposo e meus pais por serem suporte nessa trajetória.

A minha orientadora Elisa Raquel Anastácio Ferraz Avelino e coorientadora Andréia Fernandes por aceitarem viver essa experiência comigo. Obrigada pelo conhecimento compartilhado e por amarem ensinar, o que tornou o aprendizado durante o mestrado mais enriquecedor.

Ao professor Israel Felzenszwalb por me acolher no Laboratório de Mutagênese Ambiental (LABMUT) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro- UERJ.

À minha companheira de laboratório, Carine Gonçalves, pela agradável e proveitosa convivência.

À professora Danielle Palma Oliveira por ceder o dietilfosfinato de alumínio para a realização desses experimentos.

Ao professor Daniel Dorta Junqueira e sua aluna Caroline Sampaio por realizarem a solubilização da minha amostra.

À Universidade Federal Fluminense (UFF), ao Programa de Pós Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPG-CAPS) e ao Programa de Demanda Social da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento e aprendizado.

Tarde Vos amei,
ó Beleza tão antiga e tão nova,
tarde Vos amei!
Eis que habitáveis dentro de mim,
e eu, lá fora, a procurar-Vos!
Disforme, lançava-me sobre estas formosuras que criastes.
Estáveis comigo e eu não estava Convosco!
Retinha-me longe de Vós
aquilo que não existiria,
se não existisse em Vós.
Porém, chamastes-me,
com uma voz tão forte,
que rompestes a minha Surdez!
Brilhastes, cintilastes,
e logo afugentastes a minha cegueira!
Exalastes Perfume:
respirei-o, a plenos pulmões, suspirando por Vós.
Saboreei-Vos
e, agora, tenho fome e sede de Vós.
Tocastes-me
e ardi, no desejo da Vossa Paz

Agostinho de Hipona

Resumo

O dietilfosfinato de alumínio (ALPI) é um composto usado como retardante de chama livre de halogênio. Os retardantes de chama, cruciais na prevenção de incêndios, são amplamente usados em todo o mundo, com consumo medido em toneladas. Além disso, esses compostos pertencem ao grupo dos contaminantes emergentes, substâncias que apresentam riscos à saúde humana e ambiental, ainda sem limites de segurança definidos e, portanto, não monitoradas. Para avaliar a toxicidade de ALPI, os seguintes testes foram realizados: (i) ensaio de mutagenicidade usando o ensaio de *Salmonella* / microssoma, (ii) ensaios de viabilidade celular por interferência na atividade das desidrogenases mitocondriais (ensaio WST-1) e alteração na membrana plasmática integridade (ensaio de LDH) e (iii) ensaio de genotoxicidade de micronúcleo usando a linhagem celular de hepatoma humano HepG2. Os resultados mostraram que ALPI não induziu mutação pontual nas cepas de *Salmonella enterica sorovar typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104 na ausência ou presença de ativação metabólica (mistura S9), nem causou citotoxicidade nas células HepG2 por interferência na atividade mitocondrial desidrogenases ou ruptura da membrana plasmática. O ensaio de micronúcleo indicou genotoxicidade de ALPI na concentração de 200 µg/mL com a maior parte das células sofrendo pelo menos uma divisão. Esse trabalho forneceu dados sobre o perfil de toxicidade do ALPI *in vitro* e contribuiu para os estudos de toxicidade humana para esse composto.

Palavras chave: contaminantes emergentes; genotoxicidade; mutagenicidade; citotoxicidade; HepG2; ensaio *salmonella* microssoma.

Abstract

Aluminum diethyl phosphinate (ALPI) is a compound used as a halogen-free flame retardant. Flame retardants are crucial in fire prevention and are thus widely used worldwide, with consumption measured in tons. In addition, these compounds belong to the group of emerging contaminants, substances that pose risks to human and environmental health, still without defined safety limits and therefore not monitored. To assess the toxicity of ALPI, the following tests were carried out:(i) mutagenicity assay using the *Salmonella*/microsome assay, (ii) cell viability assays by interference in mitochondrial dehydrogenases activity (WST-1 assay), and alteration in plasma membrane integrity (LDH assay), and (iii) micronucleus genotoxicity assay using the human hepatoma cell line HepG2. The results showed that ALPI did not induce point mutation in *Salmonella enterica sorovar typhimurium* strains TA97, TA98, TA100, TA102 and TA104 in the absence or presence of metabolic activation (S9 mix), nor caused cytotoxicity to HepG2 cells either by interference on the activity of mitochondrial dehydrogenases or plasma membrane disruption. The micronucleus assay indicated ALPI genotoxicity at a concentration of 200 µg/ml with most cells undergoing at least one division. This research provides data on the toxicity profile of ALPI *in vitro* and contributes to human toxicity studies for this compound.

Key words: emerging contaminants; genotoxicity; mutagenicity; cytotoxicity; HepG2; *Salmonella* microsome assay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Requisitos para listar uma substância como poluente orgânico persistente (POP) de acordo com o anexo D da convenção de Estocolmo.	20
Figura 2	Estrutura básica dos metais fosfinatos	23
Figura 3	Estrutura química do dietilfosfinato de alumínio	23
Figura 4	Conversão do WST-1 em formazan através das desidrogenases mitocondriais dependentes de NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo), alterando a coloração do cromóforo que pode ser medido através da técnica de espectrofotometria. WST-1: (4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazólio]-1,3-benzeno dissulfonato).	25
Figura 5	Conversão do lactato em piruvato através da lactato desidrogenase dependente de NADH e do sal tetrazólico INT em sal de formazan. LDH:lactato desidrogenase. INT: cloreto de 2-p-iodofenil-3-p nitrofenil tetrazólio. Catalisador: Diaforase.	26
Figura 6	Possíveis destinos de células bloqueadas por citocinesia cultivadas após exposição a agentes citotóxicos/ genotóxicos.	29
Figura 7	Célula HepG2 mostrada em baixa densidade (a) e alta densidade (b)	32
Figura 8	Percentual de sobrevivência celular para as cepas TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104 de *Salmonella enterica sorovar typhimurium* após 24h de exposição a diferentes concentrações de dietilfosfinato de alumínio (ALPI) CN:Água estéril. *p<0.05 por One-way ANOVA e Dunnett's.	43
Figura 9	Número de revertentes das cepas TA97. TA98, TA100, TA 102 e TA104 após exposição ao dietilfosfinato de alumínio na ausência de metabolização exógena. Números acima das barras correspondem ao Índice de Mutagenicidade (IM). CN(controle negativo): Água estéril; CP (controle positivo): 4-Nitroquinolina-N-Óxido 5 µg/mL, 4-Nitroquinolina-N-Óxido 5 µg/mL e metilmetano sulfonato 2,5mg/mL, respectivamente. *p<0.05 por One-way ANOVA e Dunnett's.	45
Figura 10	Percentual de morte celular baseado na ruptura da integridade da membrana plasmática (LDH) e na interferência na atividade de desidrogenases mitocondriais (WST-1) das células HepG2 após 24h, 48h e 72h de exposição a diferentes concentrações de dietilfosfinato de alumínio. CN:Água estéril. CP: Triton X-100. *p<0.05 por One-way ANOVA e Dunnett's.	47

Figura 11 Imagens de células mononucleadas (A) binucleadas(B), polinucleadas-três ou mais núcleos (C) vistas com objetiva de 40x após bloqueio por citocalasina. 48

Figura 12 Percentual de micronúcelos em células HepG2 binucleadas após exposição ao dietilfosfinato de alumínio. CN (controle negativo): Água destilada estéril; CP (controle positivo):Benzo-α-pireno 0.1mg/mL. *p<0.05 por One-way ANOVA e Dunnett's. 49

Figura 13 Células binucleadas com micronúcleos vistas pela objetiva de 40x após bloqueio por citocalasina 49

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Avaliação da citotoxicidade do dietilfosfinato de alumínio (ALPI) em células HepG2	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Propriedades físico-químicas do dietilfosfinato de alumínio 22

Quadro 2 Classes de retardantes de chama livres de halogênios (HFFR) 24

Quadro 3 Características genotípicas e fenotípicas de determinadas cepas utilizadas no ensaio *Salmonella*/microssoma 28

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	Cálculo da frequência de micronúcleo em células binucleadas	41
Equação 2	Cálculo do índice de proliferação de bloqueio da citocinese	41
Equação 3	Cálculo do índice de replicação	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALPI	Dietilfosfinato de alumínio (*Aluminium diethyl phosphinate*)
APP	Polifosfato de amônio (*Ammonium polyphosphate*)
ATH	Trihidróxido de alumínio (*Aluminum trihydroxide*)
ATO	Trióxido de antimônio (*Antimony trioxide*)
BDE-154	2,2 ′, 4,4 ′, 5,6′-hexabromodifenil éter (*2,2′,4,4′,5,6′ hexabromodiphenyl ether*)
BDE-209	Éter decabromodifenílico (*decabromodiphenyl ether*)
BDE-47	2,2 ′, 4,4′-tetrabromodifenil éter (*2,2′,4,4′-tetrabromodiphenyl ether*)
BDE-99	2,2 ′, 4,4 ′, 5-pentabromodifenil éter (*2,2′,4,4′,5 pentabromodiphenyl ether*)
BDEs	Éteres difenílicos bromados (*Brominated diphenyl ethers*)
BDP	Bisfenol A bis difenil fosfato (*Bisphenol A-Bis Diphenyl Phosphate*)
BPS	Poliestireno bromado (*Brominated polystyrene*)
CPE	Contaminantes de preocupação emergente
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Médium*
DOPO	9,10- diidro-9-oxa-10-fosfafenantreno- 10-óxido (*9,10-Dihydro-9-oxa-10-phosphaphenanthrene-10-oxide*)
FDA	*Food and Drug Administration*
HBB	Hexabromobifenil (*hexabromobiphenyl*)
HFFR	Retardantes de chama livres de halogênios (*Halogen Free Fire Retardant*)
INT	cloreto de 2-(p-iodofenil)-3 (p-nitrofenil)-5-fenilltetrazólio (*2-p-iodophenyl -3- 4-nitrophenyl -5-phenyl chloride tetrazolium)*
IPBC	Índice de proliferação por bloqueio da citocinese
LDL	Lactato desidrogenase (*Lactate dehydrogenase*)

LOEC	Menor concentração com efeito observável (*Lowest observed effect concentration)*
MHO	Hidróxido de magnésio (*Magnesium Hydroxide*)
MMT	Montmorilonita (*Montmorillonite*)
MNBC	Micronúcleo com bloqueio de citocinese
MPP	Polifosfato de melanina (*Melamine pyrophosphate*)
NAD^+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PBBs	Bifenilas polibromadas (*Polybrominated biphenyl*)
PCBs	Bifenilas policloradas (*Polychlorinated biphenyls*)
POPs	Poluentes orgânicos persistentes
RDP	Resorcinol bis difenilfosfato (*Resorcinol bis diphenyl Phosphate*)
SFB	Soro fetal bovino
TBBPA	Tetrabromobisfenol A (*Tetrabromobisphenol A*)
TPP	Trifenilfosfato (*Triphenyl phosphate*)
WST-1	*Water soluble tetrazolium salt* -1
ZHS	Hidróxido estanato de zinco (*Zinc hydroxystannate*)
ZS	Estanato de zinco (*Zinc stannate*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **18**
1.1. Contaminantes emergentes 18
1.2. Retardantes de chama 18
1.3. Retardantes de chama livres de halogênio: Compostos organofosforados 22
1.4. Dietilfosfinato de alumínio 22
1.5. Citotoxicidade 24
1.6. Genotoxicidade e mutagenicidade 26
1.6.1. Mutações gênicas 26
1.6.2. Mutações cromossômicas 28
1.7. Métodos alternativos em análises toxicológicas 29
1.7.1. Ensaios in vitro e linhagem celular HepG2 30
2. JUSTIFICATIVA **33**
3. OBJETIVOS **34**
3.1. Objetivo geral 34
3.2. Objetivos específicos 34
4. METODOLOGIA **35**
4.1. Dietilfosfinato de alumínio(ALPI) 35
4.2. Ensaio de mutagenicidade *Salmonella/* microssoma 35
4.2.1. Preparo das soluções 35
4.2.2. Ensaio de sobrevivência 37
4.2.3. Ensaios *Salmonella enterica sorovar typhimurium* 37
4.3. Ensaios de viabilidade celular 38
4.3.1. Cultivo e manutenção das células HepG2 38
4.3.1.1. Descongelamento de células HepG2 38
4.3.1.2 Repique e manutenção das células HepG2 39
4.3.1.3 Congelamento das células HepG2 39
4.3.2. Contagem das células para ensaio 39
4.3.3. Ensaio de WST-1 39
4.3.4. Ensaio LDH 40
4.4. Ensaio de Micronúcleo com bloqueio de citocinese (MNBC) 40
4.5. Análise estatística 41

5. RESULTADOS **42**
5.1. Ensaios *Salmonella enterica sorovar typhimurium* 42
5.1.1 Ensaio de sobrevivência 42
5.1.2 Ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/ microssoma 44
5.2. Ensaio WST-1 46
5.3. Ensaio LDH 46
5.4. Ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese 47
6. DISCUSSÃO **50**
7. CONCLUSÃO **55**
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **56**

1. INTRODUÇÃO

1.1 Contaminantes de preocupação emergente

Os contaminantes de preocupação emergente (CPE) são um grupo de diferentes produtos químicos - de origem antrópica ou natural - ou microrganismos, persistentes no meio ambiente e/ou com potencial nocivo para o ecossistema e saúde humana. A literatura científica reporta poucos dados a respeito de sua toxicidade. Essas moléculas podem contaminar diversas matrizes ambientais, a exemplo da água. Seus limites seguros de exposição ainda não foram estabelecidos, não sendo comumente monitorados no meio ambiente. Esses contaminantes não são, necessariamente, novos. Pertencem a esse grande grupo os plastificantes, cianotoxinas, nanomaterias, retardantes de chama, praguicidas, medicamentos, entre outros (SAUVÉ; DESROSIERS, 2014).

1.2 Retardantes de chama

O termo "retardantes de chama" refere-se a uma variedade de substâncias com diferentes estruturas e propriedades moleculares, que ao serem adicionadas em materiais como móveis, dispositivos eletrônicos, materiais para construção civil e produtos de transporte evitam a iniciação de incêndios ou retardam a propagação do fogo, através de mecanismos físicos ou químicos (EFRA, 2007).

O retardamento através de ação física ocorre por três mecanismos (EHC-192, 1997):

- Resfriamento: esses retardantes se decompõem por reações endotérmicas e resfriam o sistema a temperaturas inferiores à requerida para o processo de pirólise;
- Diluição: incorporação de substâncias inertes que quando decompostas liberam gases que diluem os combustíveis nas fases sólidas e gasosas tornando o ponto de fulgor mais elevado;
- Formação de camada protetora: substâncias sólidas ou gasosas que protegem a fase condensada combustível da fase gasosa, resfriando a fase condensada e impedindo a transferência de calor e o seu contato com o oxigênio.

Por ação química o retardamento da combustão ocorre por reações da fase gasosa ou condensada (EHC-192, 1997):

- Reações na fase gasosa: os retardantes de chama eliminam os radicais livres, interferindo nos processos de combustão;

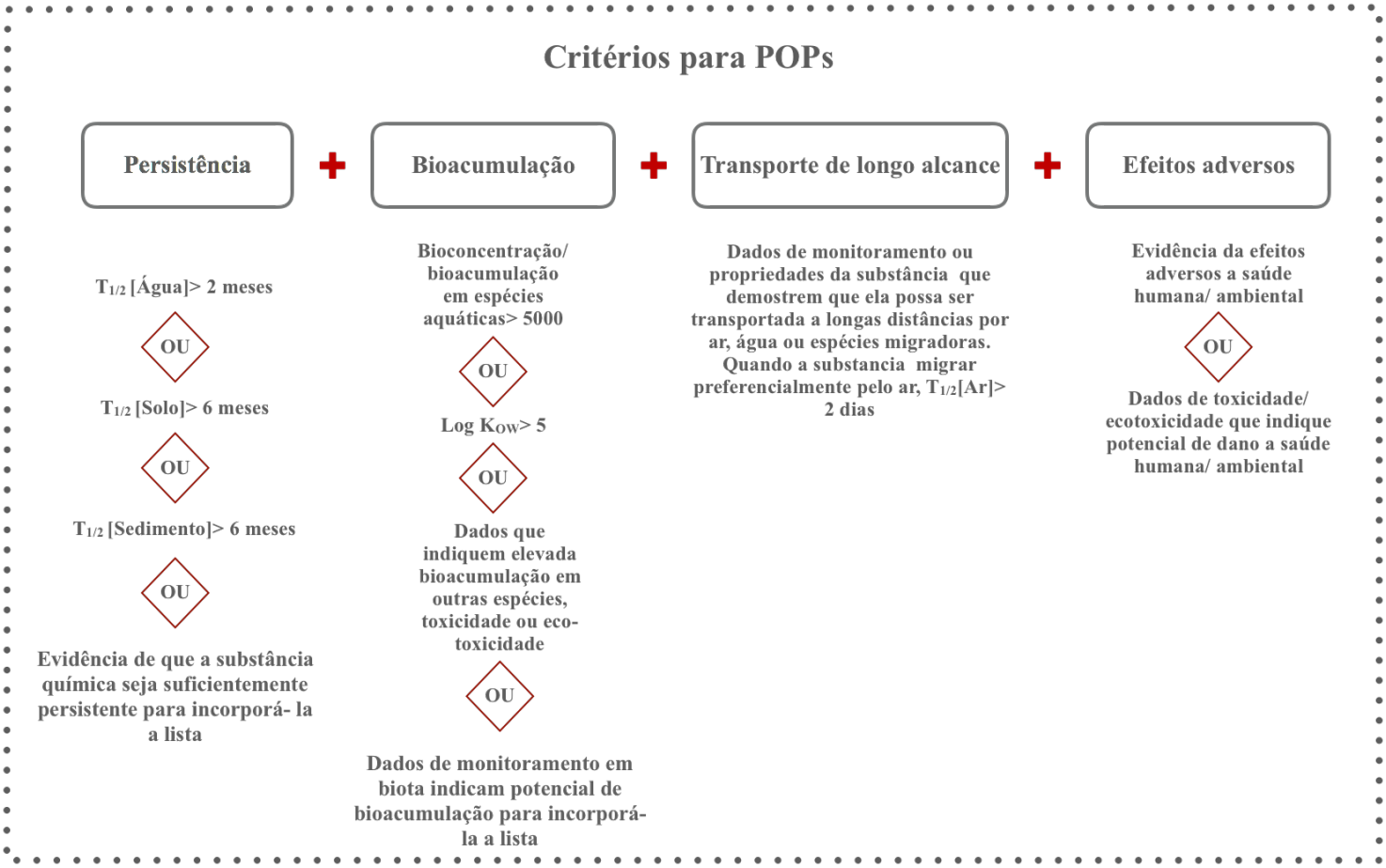
- Reações na fase condensada: os retardantes podem reagir com o polímero, acelerando sua fragmentação, diminuindo o número de fragmentos na esfera de influência da chama ou levando à formação de uma camada de carbono na superfície do material que funcionará como uma camada protetora.

Os retardantes de chama podem ser divididos em inorgânicos, halogenados, organofosforados e à base de nitrogênio (EHC-192, 1997). Seu uso remonta épocas bem antigas com aplicabilidade em redução da inflamabilidade de algodão e madeira. Registros do historiador Herodoto (484- 431a.C) mostram que os Egípcios mergulhavam a madeira em alúmen (sulfato duplo de alumínio e potássio) para reduzir sua inflamabilidade. Os romanos, dois séculos mais tarde, também usavam o alúmen, porém com a adição de vinagre na madeira (HINDERSINN, 1990).

Foi, porém, na década de 30 que as PCBs (bifenilas policloradas) começaram a ser usadas comercialmente em fluidos dielétricos e de troca de calor, entre outras aplicações, sendo no final da década de 70 banidos da América do Norte devido a sua persistência, toxicidade e bioacumulação no meio ambiente (SAUVÉ; DESROSIERS, 2014). Em 1981 foram proibidas no Brasil através da portaria interministerial 019 (EXECUTIVO, 02/02/81). Apesar das proibições, os problemas ambientais relacionados as PCBs persistem, sendo encontradas até mesmo em regiões polares (FRANCE, 1997; CORSOLINI; *et al.*, 2011).

Os compostos polibromados substituíram as PCBs e devido ao baixo custo, elevada eficiência contra a disseminação de chamas e fórmulas adaptáveis a polímeros tornaram-se os mais utilizados (ALAEE *et al.,* 2003). Entretanto, em consequência aos estudos que apontam para a toxicidade, bioacumulação e persistência dessa classe de compostos, alguns foram considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs) e entraram na lista da convenção de Estolcomo. A figura 1 mostra os critérios para uma substância ser classificada como poluente orgânico persistente (PIERONI; LEONELB; FILLMANNA, 2016; DREYER *et al.*, 2019; HALES; ROBAIRE, 2020).

Figura 1- Requisitos para listar uma substância como poluente orgânico persistente (POP) de acordo com o anexo D da Convenção de Estocolmo



Fonte: Adaptado de (UNEP, 2019)

A Convenção de Estocolmo realizada em 2001 objetivou a eliminação e/ou restrição dos estoques e resíduos de poluentes orgânicos persistentes (POPs), a diminuição da liberação de suas emissões não intencionais no meio ambiente, além da identificação e gestão de áreas contaminadas por essas substâncias. A partir desses objetivos, ela institui que os Países-Parte adotem medidas de controle nas etapas de produção, importação, exportação, uso e destinação final dos POPs contidos nos seguintes anexos (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2004):

ANEXO A- POPs para serem eliminados

ANEXO B- POPs com uso restrito

ANEXO C- POPs produzidos não intencionalmente

Essa convenção inclui, até o momento, em seu anexo A (Eliminação) cinco grupos de retardantes de chama bromados, que são: hexabromobifenil (HBB), hexabromociclododecano (HBCDD), misturas comerciais penta/octabromodifenis éter (penta/octa-BDE) e o éter decabromodifenílico (deca-BDE), que foi o último a ser incorporado à lista. No entanto, existem isenções de uso e produção por um tempo determinado para alguns países, entre eles o Brasil (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2004).

Apesar de estar presente na convenção de Estocolmo, falta, no Brasil, legislação específica com concentrações limites para éteres difenil-polibromados (PBDEs) ou hexabromociclododecanos (HBCDs) nos produtos comerciais e residuais, e proibições de importações ou exportações desses produtos. Em 2009 ocorreu uma tentativa, o projeto de lei do senado nº173, que propôs concentração inferior a 0,1% de difenilpolibromados (PBBs), PBDEs, cromo hexavalente, mercúrio e chumbo nos computadores e equipamentos de informática (SENADO FEDERAL, 2009). Esse projeto foi arquivado em 2011. Em 2010 foi elaborada uma instrução normativa sobre critérios ambientais na aquisição ou contratação de serviços e obras por órgãos públicos que diz no capítulo III, art 5º (BRASIL, 2010):

> *"os bens não contenham substâncias perigosas em concentração acima da recomendada na diretiva RoHS (Restriction of Certain Hazardous Substances), tais como mercúrio (Hg), chumbo (Pb), cromo hexavalente (Cr(VI)), cádmio (Cd), bifenil-polibromados (PBBs), éteres difenil-polibromados (PBDEs)".*

Adjacente ao banimento de determinados retardantes de chama bromados está a necessidade de novas alternativas para substituí-los, visto a contribuição desses compostos para a segurança dos consumidores contra incêndios. Uma classe que vem sendo usada como substituta é a dos retardantes de chama livres de halogênio (HFFR), os quais possuem comportamento ambiental e riscos à saúde humana poucos compreendidos (WAAIJERS *et al.*, 2013a).

As principais categorias que possuem HFFR são: retardantes de chama inorgânicos e sinérgicos, compostos organofosforados e seus sais, retardantes de chama a base de nitrogênio e sistema intumescente, como mostrado no quadro 1 (WAAIJERS *et al.*, 2013b).

Quadro 1- Classes de retardantes de chama livres de halogênios (HFFR)

Retardantes de chama livres de halogênios			
Retardantes de chama inorgânicos e sinérgicos	**Compostos organofosforados e seus sais**	**Retardantes de chama a base de nitrogênio**	**Sistema intumescente**
Hidróxido de alumínio	Trifenilfosfato (TPP)	Polifosfato de melamina	Pentaeritritol
Hidróxido de magnésio	Resorcinol bis (difenil fosfato) (RDP),		
Fosfato de amônio	Bisfenol-A bis (difenil fosfato) (BDP)		
Borato de Zinco	9,10-diidro-9-oxa-10-fosfenantreno-10-óxido (DOPO)		
Hidroxistanato de zinco	Dietilfosfinato de alumínio (ALPI)		
Estanato de zinco			

Fonte: Adaptado de (WAAIJERS *et al.*, 2013a).

1.3 Retardantes de chama livres de halogênio: Compostos organofosforados

A classe dos retardantes de chama a base de fósforo abrange substâncias inorgânicas e orgânicas que podem conter halogênios. Faz parte dos retardantes organofosforados os ésteres de fosfatos, fósforo vermelho, fosfonatos e fosfinatos, os quais na presença de calor agem principalmente na fase sólida através da formação de ácido fosfórico, que gera uma camada protetora de carbono. Quando há presença de halogenados, o mecanismo predominante é o de fase gasosa, no qual os átomos de halogênios removem os radicais H^+ e OH^- do processo de combustão (EFRA, 2007; VEEN; BOER, 2012).

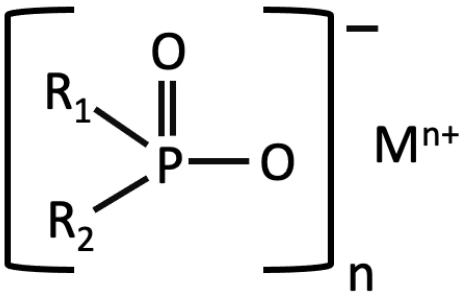
Esses retardantes de chama são utilizados em plásticos de engenharia, termofixos, espumas de poliuretano, revestimentos e têxteis (EFRA, 2007). Podem ser classificados em reativos quando o retardante de chama é ligado quimicamente ao polímero; ou aditivos quando estão dispersos nas matrizes poliméricas em vez de serem quimicamente ligados. Isso favorece a sua liberação para o ambiente por volatilização, abrasão ou lixiviação quanto maior for a pressão de vapor do retardante de chama (Agência de proteção ambiental Americana, do inglês *United States Environmental Protection Agency*- US.EPA, 2005).

A classe dos organofosforados livres de halogênios inclui dentre outros compostos mostrados no quadro 1 o dietilfosfinato de alumínio (ALPI) (WAAIJERS *et al.*, 2013a), que está dentro dos compostos dessa classe com interesse para a indústria (PINFA, 2016).

1.4 Dietilfosfinato de alumínio

O dietilfosfinato de alumínio (ALPI- CAS N^0: 225789-38-8) é um composto pertencente ao grupo dos metais fosfinatos, cuja estrutura básica encontra-se na figura 2 (WAAIJERS; KONG; HENDRIKS; DE WIT *et al.*, 2013a).

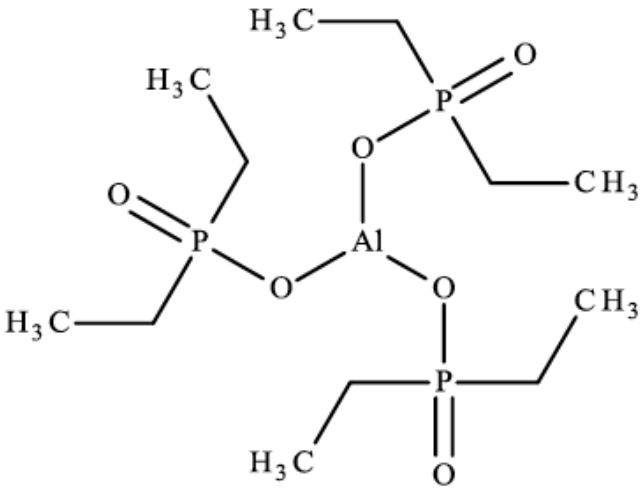
Figura 2- Estrutura básica dos metais fosfinatos



Fonte: Adaptado de (PINFA, 2016)

A estrutura química do ALPI está apresentada na figura 3 e suas propriedades físico-químicas no quadro 2 (CLARIANT; TOXSERVICES, 2016).

Figura 3- Estrutura química do dietilfosfinato de alumínio.



Fonte: (CLARIANT; TOXSERVICES, 2016)

O ALPI é formado por três grupos dietilfosfinato, cada um deles organizado em uma estrutura tetraédrica e ligados a um íon Al^{+3}. Sua apresentação é na forma de um pó branco, cuja fórmula molecular é $3C_4H_{11}PO_2.Al$.

Quadro 2- Propriedades físico-químicas do dietilfosfinato de alumínio

Nome	Dietilfosfinato de alumínio
Fórmula química	$3C_4H_{11}PO_2 \cdot Al$
Massa molecular/ g.mol -1	390,27
Pressão de Vapor / Pa (a 25ºC)	<10-8
Ponto de Fusão / ºC	≥ 300°C
Solubilidade em Água / mg/L	≤ 2.5×103 a 25°C
Coeficiente de Partição Octanol/Água (Kow)	0,44

Fonte: Adaptado de (U.S.EPA, 2014)

As propriedades físico químicas são capazes de demonstrar o estado físico em que uma substância será encontrada no meio ambiente, sua polaridade, vias de exposição mais prováveis bem como a capacidade de se acumular na biota. A análise dessas propriedades do ALPI é capaz de mostrar que ele é um sólido à temperatura ambiente, hidrofílico, apesar de ter baixa solubilidade em água, com tendência a se distribuir pela água e ar, que são observados a partir de seu valor de Kow (coeficiente de partição octanol/ água) <1, ponto de fusão >25 °C e pressão de vapor < 10^{-8} (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

O ALPI pode ser aplicado para poliamidas, poliésteres e resinas termofixas. Comercialmente é conhecido como Exolit OP930, Exolit OP935, Exolit OP945 Exolit OP 1230 e Exolit OP 1240 (CLARIANT; TOXSERVICES, 2016).

O ALPI é um composto emergente e, consequentemente, há poucas informações científicas sobre sua toxicidade para o meio ambiente e seres humanos.

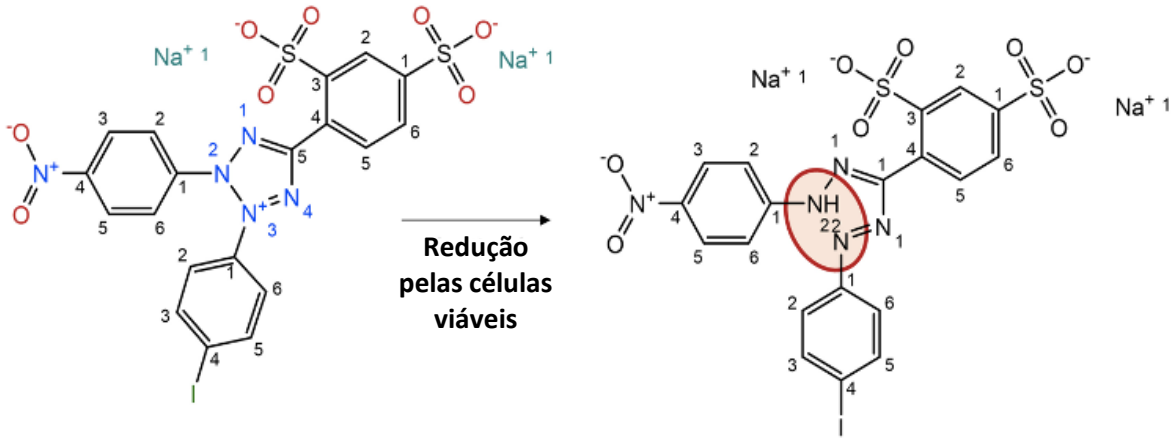
1.5 Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxidade *in vitro* são importantes para identificar a capacidade de um composto causar morte celular, o mecanismo pelo qual esse efeito acontece, além de indicar a faixa de concentração do composto a ser usada nos próximos ensaios *in vitro*. Os alvos mais frequentemente estudados nesses testes são baseados na alteração da permeabilidade celular, diminuição da função mitocondrial e alterações na morfologia e replicação celular (EISENBRAND *et al.*, 2002).

Dentre os ensaios que analisam a viabilidade celular existem o *Water Soluble Tetrazolium Salt* -1 (WST-1), que analisa efeitos na atividade das desidrogenases mitocondriais, e o ensaio de determinação da desidrogenase lática (LDH), que analisa dano à membrana celular. O WST-1 se baseia na redução do íon (4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazólio]-1,3-benzeno dissulfonato) pela enzima desidrogenase dependente de NAD(P)H nas mitocôndrias das células metabolicamente ativas para gerar Formazan, o qual apresenta uma coloração amarela e pode ser analisado por espectrofotometria, como mostrado

na figura 4. Essa conversão ocorre somente nas células que não possuem alteração nas enzimas mitocondriais oxidativas, ou seja, nas células viáveis (ISHIYAMA *et al.*, 1997).

Figura 4- Conversão do WST-1 em formazan através das desidrogenases mitocondriais dependentes de NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo), alterando a coloração do cromóforo que pode ser medido através da técnica de espectrofotometria. WST-1: (4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazólio]-1,3-benzeno dissulfonato).

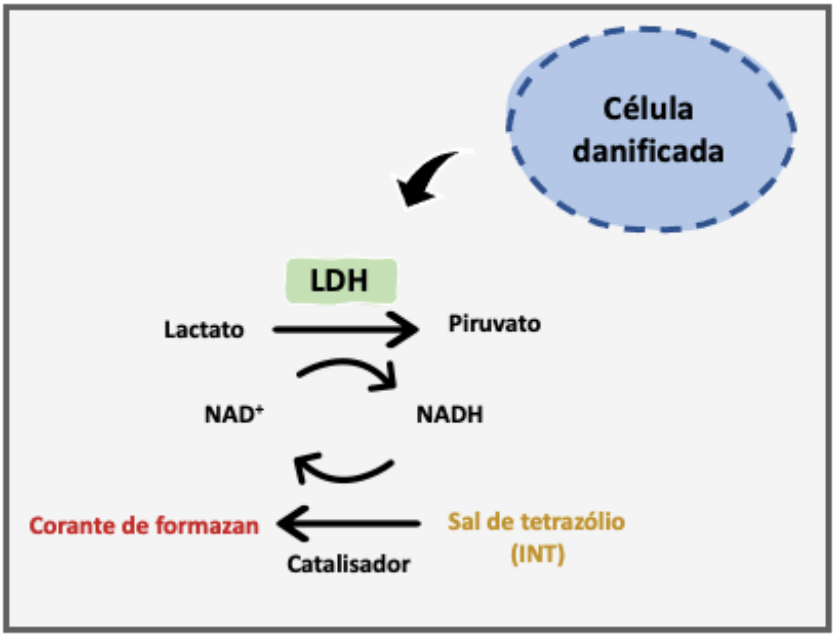


WST-1 tetrazólio (Amarelo claro) **WST-1 tetrazólio (Amarelo escuro)**

Fonte: JOOA *et al.*, 2019

O ensaio de LDH mede a integridade da membrana celular através da atividade da lactato desidrogenase, encontrada no citoplasma de todas as células. Existem 5 isoformas dessa enzima e todas possuem uma função em comum: catalisar a conversão do lactato em piruvato, acompanhada da redução NAD^+ em NADH. Esse ensaio avalia a lise celular através do extravasamento da lactato desidrogenase do ambiente citoplasmático por meio do uso do substrato cloreto de 2-p-iodofenil-3-p nitrofenil tetrazólio (INT), um sal tetrazólico amarelo que não entra na célula e sofre redução pelo NADH, participante da reação de formação do piruvato, conforme mostrado na figura 5. O sal formazan de coloração vermelha gerado é medido por espectrofotometria. Ou seja, a quantidade do INT reduzido é diretamente proporcional à quantidade de LDH na cultura, a qual está relacionada com células mortas por dano à membrana plasmática (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018).

Figura 5- Conversão do lactato em piruvato através da lactato desidrogenase dependente de NADH e do sal tetrazólico INT em sal de formazan. LDH: lactato desidrogenase. INT: cloreto de 2-p-iodofenil-3-p nitrofenil tetrazólio. Catalisador: Diaforase.



Fonte: Elaborada pelo autor

1.6 Genotoxicidade e mutagenicidade

Genotoxicidade se refere à capacidade de determinados agentes químicos, físicos ou biológicos causarem dano ao DNA. Quando esses danos ocorrem no DNA e são perpetuados para células filhas durante a replicação, o composto é chamado de mutagênico. As mutações podem ocorrer em dois diferentes níveis: mutação gênica (ou mutação de ponto) e mutação cromossômica (GUTZKOW, 2015).

1.6.1 Mutações gênicas

As mutações gênicas afetam um único par de bases ou um pequeno número de pares de bases adjacentes e incluem substituições, deleções e adições de bases. As substituições podem levar à formação de um aminoácido diferente e por sua vez à outra proteína. A adição e deleção de pares de bases podem alterar o quadro de leitura, em razão da sequência do mRNA ser lida em códons (grupo de 3 pares de bases) interferindo na sequência nucleotídica e na proteína final (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

Para avaliar mutações pontuais induzidas por agentes químicos, o ensaio *Salmonella/*microssoma desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames e colaboradores em 1975, é um dos mais empregados. Faz parte da bateria de ensaios recomendados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para determinar a mutagenicidade de novas drogas e substâncias químicas, uma vez que há um alto valor preditivo para carcinogenicidade em roedores quando uma resposta mutagênica é obtida (FDA, 2012, MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Esse teste utiliza cepas de *Salmonella enterica sorovar Typhimurium* (*S. typhimurium*), derivadas da parental LT2, com mutações em *loci* específico responsável pela biossíntese do aminoácido histidina, impedindo sua produção, e por isso, só proliferam em meio de cultura acrescido desse aminoácido. Quando essa cepa mutante entra em contato com um agente mutagênico, o genótipo his^- pode ser revertido para his^+, levando ao crescimento de colônias em meio pobre em histidina de composição definida (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Algumas substâncias químicas são inativas biologicamente, mas possuem metabólitos intermediários ativos que são, em grande número, formados pela metabolização em humanos através do complexo citocrômico P450. Devido à ausência desse sistema em bactérias e a fim de mimetizar a resposta toxicológica em mamíferos, é utilizada a fração microssomal S9, que é um homogenato de fígado de ratos *Sprague-Dawley*, ou outras espécies de roedores, pré-tratados com bifenil policrolinato (Aroclor 1254) (CLAXTON *et al.*, 1987).

A Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), órgão não governamental responsável pelas diretrizes de desenvolvimento, recomenda a utilização de pelo menos 5 cepas de bactérias para a análise mutagênica de compostos químicos, dentre elas as cepas TA97, TA98, TA100, 102 e TA104 (OECD, 1997).

A cepa TA97 de *S.typhimurium* possui mutação no *locus hisGD6610*, que quando modificada leva à deleção de um par de bases, reestabelecendo o quadro de leitura. A TA98 possui mutação no *locus hisD3052* que também, quando alterada, reestabelece o quadro de leitura e a TA100 possui mutação em *hisG46*, que detecta mutação de ponto do tipo substituição de pares de bases. Ambas, TA98 e TA100 são utilizadas para estudar o metabolismo de nitrocarcinógenos, já que são deficientes em nitroredutases. A TA102 e TA104 possuem mutação no *locus his G428* que é capaz de detectar agentes mutagênicos oxidativos, pois diferente das outras cepas, o par de bases A:T (adenina:timina) que sofre substituição e não o C:G (guanina:citosina) (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Para aumentar a sensibilidade do ensaio, todas as cepas utilizadas possuem deleção no gene *rfa*, importante na síntese de lipopolissacarídeos da membrana celular de bactérias gram negativas, tornando-as mais permeáveis a grandes moléculas. O plasmídeo pKM101 presente em algumas cepas de *S. typhimurium* aumenta a frequência de mutagênese espontânea provavelmente pela via de reparo do DNA propensa a erro. O plasmídeo pAQ1 amplifica o número de sítios específicos para mutagênese e a mutação do gene *uvrB*, responsável pelo reparo à luz ultravioleta, evita que a célula repare o dano induzido pelo agente teste (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

O quadro 3 sumariza as características genotípicas e fenotípicas das 5 cepas recomendadas pela OECD para serem utilizadas no ensaio *Salmonella*/microssoma.

Quadro 3- Características genotípicas e fenotípicas de determinadas cepas utilizadas no ensaio *Salmonella*/microssoma.

Cepas	Mutação em His	Plasmídeos	Outras mutações	Tipo de mutação detectável	
TA97	*hisD6610*	pKM 101	*rfa, (uvrB chl bio)*	Deslocamento do quadro de leitura	Adição de um par G:C
TA98	*hisD3052*	pKM 101	*rfa, (uvrB chl bio)*	Deslocamento do quadro de leitura	Adição ou deleção de um par G:C
TA100	*hisG46*	pKM 101	*rfa, (uvrB chl bio)*	Substituição de pares de bases	G:C para A:T
TA102	*hisG428*	pKM 101, pAQ1	*rfa*	Substituição de pares de bases	A:T para G:C
TA104	*hisG428*	–	*rfa, (uvrB chl bio)*	Substituição de pares de bases	A:T para G:C

Fonte: Adaptado de MORTELMANS; ZEIGER, 2000.

1.6.2 Mutações cromossômicas

As mutações cromossômicas são aquelas que alteram o número de cromossomos ou suas estruturas. As alterações no número são classificadas em euploidia aberrante quando se estendem a todo o conjunto do cromossomo, e aneuploidia quando ocorre apenas em parte do conjunto cromossômico (GRIFFITHS *et al.*, 2016).

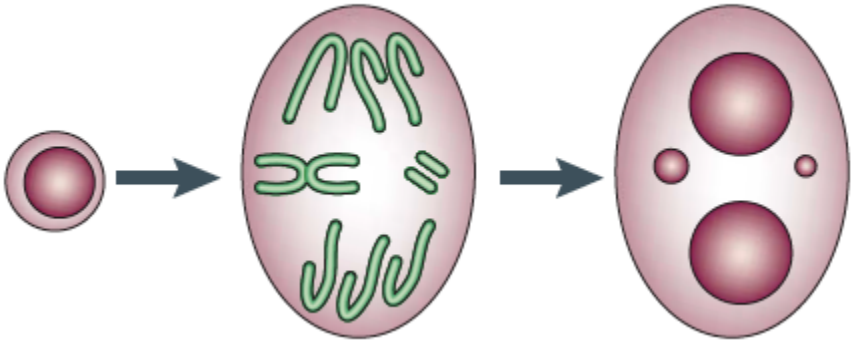
As aneuploidias são causadas durante a divisão celular por uma falha no fuso mitótico, que tem a função de separar os cromossomos igualmente pelas células filhas, ou por dano ao cromossomo que afete a sua ligação a ele. As alterações estruturais incluem deleção, duplicação, inversão ou translocação de um segmento cromossômico; quando esses danos dependem da quebra cromossômica, chama- se o evento de clastogênico (GRIFFITHS *et al.*,2016; ZEIGER, 2010).

A avaliação *in vitro* de mutações cromossômicas pode ser feita pelo ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese (MNBC), que é um teste de genotoxicidade para a detecção de micronúcleos no citoplasma de células interfásicas. O ensaio detecta a atividade de substâncias clastogênicas e aneugênicas em células submetidas à divisão celular durante ou após a exposição à substância-teste (FENECH; CROTT, 2002; OECD, 2016).

Nesse ensaio é aplicado a citocalasina B que interrompe o processo de citocinese para a observação dos micronúcleos, que podem se originar de fragmentos cromossômicos acêntricos (ou seja, sem um centrômero) ou cromossomos inteiros que não conseguem migrar para os polos durante o estágio de anáfase da divisão celular, como mostrado na figura 6. O tamanho

dos micronúcleos varia de 1/16 a 1/3 do diâmetro nuclear e possuem estrutura idêntica ao núcleo e com membrana própria (FENECH, 2007).

Figura 6- Formação de micronúcleos no ensaio de Ensaio de Micronúcleo com bloqueio de citocinese (MNBC).



Fonte: Adaptado de (FENECH, 2007).

1.7 Métodos alternativos em análises toxicológicas

A análise toxicológica busca conhecer as condições de uso seguro de uma amostra para saúde humana e ambiental. Para obtenção dessas informações é necessário fazer a análise de risco, que é composta por 4 etapas (identificação do perigo, avaliação da exposição, caracterização do perigo e caracterização do risco), em que são realizados ensaios (toxicidade aguda, subaguda, crônica, carcinogenicidade, entre outros.), principalmente usando animais, para tornar conhecida a segurança, eficácia e capacidade da substância em estudo de causar efeitos adversos (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

No entanto, a utilização disseminada de animais em experimentação já levantava críticas desde muito tempo atrás, sendo em 1876 publicada, na Grã-Bretanha, a legislação para regulamentar o emprego de animais em ensaios científicos. Apesar disso, foi apenas em 1954, com a publicação do estudo de Russel e Burch sobre o programa denominado 3Rs (*Reduction, refinement, replacement*), que no português está traduzido como redução, refinamento e substituição, que essa discussão tornou-se ampla (RUSSELL; BURCH, 1959).

O programa 3R tem como metas a (1) redução do número de animais por experimento, (2) refinamento dos ensaios através da diminuição de procedimentos desumanos que lhes causem sofrimento e (3) substituição dos animais por materiais não sencientes e que atinja os mesmo objetivos, que são os chamados métodos alternativos (RUSSELL; BURCH, 1959).

A ideia de métodos alternativos levou à formação em 1969, no Reino Unido, do fundo de substituição de animais em experimentos médicos - o FRAME (do inglês *The Fund f the Replacement of animals in Medical Experiments*) - que no ano seguinte a sua criação divulgou

metodologias para a substituição do uso de animais, as quais incluíam estudos *in vitro*, *in silico* e com modelos inferiores (RUSSELL; BURCH, 1959).

A Lei 11.794 (Lei Arouca) de outubro de 2008 dispõe, entre outras coisas, da criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) que tem como uma de suas funções o monitoramento e avaliação de metodologias alternativas utilizadas como substitutas ao uso de animais na pesquisa cientifica e ensino. Essa lei é regulamentada pelo Decreto 6899/2009 (BRASIL, 2008).

No Brasil esses métodos são definidos por meio do Decreto 6899/2009 como aqueles que não empregam o uso animais, ou os utiliza em número reduzido com eliminação/diminuição do desconforto, como também aqueles que utilizam espécies de ordens inferiores e sistemas orgânicos ex vivos. O decreto prevê ainda que esses ensaios precisam ser validados e aceitos internacionalmente de forma a garantir resultados semelhantes às metodologias substituídas e com reprodutibilidade (BRASIL, 2009).

A portaria 491 de 3 de julho de 2012 institui a rede nacional de métodos alternativos (Renama) que tem como objetivos (1) estimular o uso de métodos alternativos em vez do uso de animais, por meio de treinamento e auxílio nessas metodologias; (2) fazer uso de comparações interlaboratoriais para fiscalizar os laboratórios associados; (3) desenvolver padrões de referência químicos ou biológicos, quando cabível, para promover a qualidade dos ensaios; (4) desenvolver esforços para por em prática o sistema de qualidade laboratorial e as boas práticas de laboratório (BPL); e (5) proporcionar meios para o desenvolvimento, a validação e a certificação de novas metodologias alternativas (BRASIL, 2012).

Dentre as metodologias alternativas, os estudos *in vitro* são métodos que fornecem base para o entendimento da ação de substâncias tóxicas no organismo. Os ensaios *in vitro* são potencialmente importantes para o estudo do mecanismo de ação de agentes tóxicos e também podem ser aplicados para o estudo de metabolismo (EISENBRAND *et al.*, 2002). Apresentam outras vantagens como menor custo e tempo para se obter os resultados, além de grande número de testes disponíveis (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

1.7.1 Ensaios *in vitro* e linhagem celular HepG2

Os ensaios *in vitro* podem ser realizados em sistemas subcelulares (ex. macromoléculas e organelas celulares), celulares e tecidos inteiros (EISENBRAND *et al.*, 2002). Os ensaios celulares englobam as células primárias, linhagens celulares e cepas celulares (EKWALL *et al.,* 1990).

As culturas de células primárias são aquelas oriundas da migração de células de um fragmento de tecido aderido a um determinado substrato, ou através da desagregação enzimática ou mecânica deste tecido para originar uma suspensão de células (FRESHNEY,

2010). Essas células apresentam as características do tecido original, porém exibem, por desvantagens, baixa homogeneidade e perda rápida de especialização quando em cultura. Após a primeira subcultura, essas células deixam de ser primárias e se tornam linhagem celular (EKWALL *et al.,* 1990).

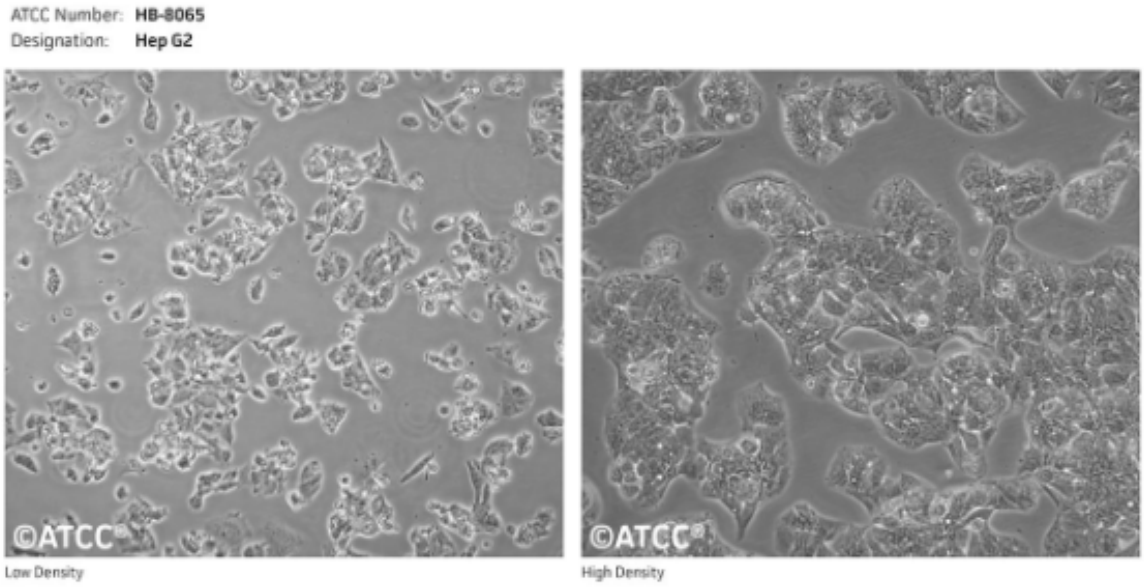
A linhagem celular pode ser classificada em finita ou contínua. A finita contém células geralmente diploides com vida útil entre 40-50 divisões. A contínua pode ser proveniente de células primárias ou linhagens celulares diploides após sofrerem transformações de origem espontânea ou induzida (quando por vírus ou agentes químicos e físicos) (EKWALL *et al.,* 1990). Essas transformações podem gerar características como a imortalização, crescimento aberrante e malignidade (FRESHNEY, 2010). As linhagens celulares apresentam facilidade de cultivo e de resultados reprodutíveis. Como desvantagem, tem a perda de similaridade com o tecido de origem, no caso das linhagens contínuas (EKWALL *et al.*, 1990).

A cepa celular é obtida a partir da seleção de células com determinadas características, procedentes de cultura primária ou linhagem celular, as quais precisam ser mantidas durante o cultivo subsequente. Esse tipo celular apresenta população mais homogênea, porém é limitada as mesmas desvantagens da linhagem celular de origem (EKWALL *et al.,* 1990).

O fígado é um órgão de grande importância para o metabolismo de substâncias e por isso modelos celulares de hepatócitos são escolhidos para estudos de toxicidade. Dentre os modelos celulares usados têm-se as culturas primárias e linhagens celulares imortalizadas (SOLDATOW *et al.,* 2012). O uso desse último modelo apresenta vantagens em relação aos hepatócitos primários, uma vez que possui fácil manuseio, vida longa, reprodutibilidade experimental e pode reter a expressão de funções específicas do fígado (GÓMEZ LECHÓN; TOLOSA; DONATO, 2014). Exemplos de linhagens celulares imortalizadas de hepatócitos são HBG, Hep3B, Fa2N-4PLc / PRFs Huh7, HepaRG e HepG2 (SOLDATOW; LECLUYSE; GRIFFITH; RUSYN, 2012).

As células HepG2, mostradas na figura 7 são oriundas da biópsia de hepatocarcinoma humano de um homem caucasiano de 15 anos de idade. Esse modelo celular é altamente proliferativo e possui crescimento aderente (ATCC- American Type Culture Collection, 2021). Além disso, apresenta muitas funções parenquimais conservadas com a expressão de várias proteínas plasmáticas hepáticas (KIRBY; VOUROS; KARGER, 1980).

Figura 7- Célula HepG2 mostrada em baixa densidade (a) e alta densidade(b)



(a) (b)

Fonte: (ATCC, 2021)

Um estudo realizado em 2003 avaliando o uso do modelo celular HepG2 para estudos de genotoxicidade mostrou que essas células são ferramentas para estudos de danos ao DNA e efeitos clastogênicos ou aneugênicos causados por agentes genotóxicos de maneira direta e indireta (VALENTIN-SEVERIN; HEGARAT; LHUGUENOT; BON *et al.*, 2003). Diamond e colaboradores (1980) também mostraram a capacidade dessas células metabolizarem xenobióticos e auxiliarem na detecção de agentes com potencial carcinogênico (BAIRD, 1980; DIAMOND *et al.*, 1980).

Corroborando com esses achados, outras pesquisas para avaliação de citotoxicidade e mecanismo tóxico de substâncias, com ensaios como viabilidade celular, integridade de membrana, formação de espécies radicalares de oxigênio, apoptose e alterações no DNA (através do ensaio de micronúcleo e cometa) tem sido desenvolvidas nesse modelo celular (GÓMEZ LECHÓN; TOLOSA; DONATO, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Os retardantes de chama têm grande importância na prevenção de incêndios e por isso são muito utilizados mundialmente, sendo o consumo anual superior a 2,39 milhões de toneladas em 2019 (IHS Markit, 2020 apud flameretardants online, 2020). Tendo em vista a toxicidade dos retardantes bromados, bastante utilizados atualmente, esforços têm sido concentrados na substituição desses compostos por retardantes livres de halogênios. Nesse sentido, a classe dos compostos organofosforados livre de halogênio tem sido uma possível alternativa ao uso de retardantes halogenados.

Apesar dos HFFRs estarem sendo usados como substitutos, estudos *in vitro* e em modelos animais apontam para capacidade neurotóxica, hepatotóxica, cardiotóxica e de atuação como interferente endócrino para alguns desses retardantes de chama (BAO *et al.*, 2017; KOJIMA *et al.*, 2013; HENDRIKS; WESTERINK, 2015; ALZUALDE *et al.*, 2018),.

O descarte de materiais contendo retardantes de chama pode tornar possível a liberação desses produtos para o ar através da volatilização, para a água, uma vez que o tratamento do lixiviado não é capaz de retira- los, e também para a cadeia alimentar por seres vivos que se alimentam em aterros (LUCAS *et al.*, 2018).

Estudos mostram que os HFFRs têm sido detectados em poeira de ambientes internos, como carros e casas (ALI *et al.*, 2013; HAO *et al*, 2018) além de águas superficiais, residuais e potáveis (HAO *et al.*, 2018; KIM; KANNAN, 2018).

Dentre os compostos organofosforados livres de halogênio que são de interesse para a indústria, encontra-se o ALPI. Uma vez que esse é um composto emergente, ainda faltam dados na literatura sobre seu perfil de toxicidade, inclusive a respeito do seu potencial mutagênico e genotóxico.

Nesse sentido, tendo em vista o uso de retardantes de chama nos mais diversos segmentos industriais, o que acaba expondo os trabalhadores assim como usuários do produto final, além do meio ambiente (ESTILL *et al.*, 2020), esse trabalho buscou avaliar a toxicidade desse composto focando nos efeitos deletérios ao DNA e citotoxicidade.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial mutagênico, citotóxico e genotóxico do retardante de chama dietilfosfinato de alumínio (ALPI).

3.2 Objetivos específicos:

-Avaliar o potencial mutagênico desse composto utilizando o ensaio *Salmonella*/microssoma;

- Avaliar a indução de morte celular induzida pelo ALPI considerando a interferência na atividade das desidrogenases mitocondriais e alteração da integridade da membrana plasmática em células HepG2;

- Avaliar o potencial genotóxico desse composto utilizando o ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese (MNBC) em células HepG2.

4. METODOLOGIA

4.1 Dietilfosfinato de alumínio (ALPI)

O ALPI (CAS: 225789-38-8, pureza de 98,5%) foi cedido pelos professores Dra. Danielle Palma de Oliveira e Dr. Daniel Junqueira Dorta, ambos da Universidade de São Paulo.

Para o ensaio de de mutagenicidade *Salmonella*/microssoma utilizou-se as concentrações 0,2; 2; 20; 200 µg/mL e para os ensaios de viabilidade e genotoxicidade foram utilizadas as concentrações 0,02; 0,2; 2; 20; 200 µg/mL de ALPI preparadas em colaboração com a Universidade de São Paulo (USP) através da diluição em água destilada estéril seguida de agitação por 12h em um homogeneizador de tubos falcon (Kasvi- modelo K45-8010) e filtração com filtro de 0,22 µm.

4.2 Ensaios *Salmonella enterica sorovar typhimurium*

4.2.1 Preparo das soluções

- Meio de Vogel Bonner (50 x):

Composto por 4,5 g de sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$), 44,7 g de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), 223 g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), 78,3 g de fosfato de sódio e amônio ($NaNH_4HPO_4.4H_2O$) e 450 mL de água destilada. Após o preparo o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

- Solução de glicose 40%:

40 g de glicose foram dissolvidos em 100 mL de água destilada, esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos e armazenados à temperatura ambiente ao abrigo da luz.

- Solução de ágar:

15 g de Bacto Agar foram dissolvidos em 930 mL de água destilada. Após o preparo o meio foi autoclavado a 121°C por 20 minutos, distribuído em placas de Petri (20 mL por placa) e armazenado.

- Agar de superfície:

6 g de Bacto Agar e 5 g de cloreto de sódio (NaCl) foram dissolvidos em 1 L de água destilada. A solução foi submetida à esterilização em autoclave a 121°C por 20 minutos e depois armazenada sob refrigeração.

- Meio mínimo para cultivo:

Adicionaram-se 20 mL do meio Vogel Bonner (50 x) e 50 mL de glicose a 930 mL da solução de agar em ambiente estéril.

- Meio Luria Bertani (LB):

Composto por 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de cloreto de sódio e 1 L de água destilada. Após o preparo o meio foi autoclavado a 121°C por 20 minutos e armazenado à temperatura ambiente.

- Meio rico para cultivo:

Composto por 10 g de triptona, 5g de extrato de levedura, 10 g de cloreto de sódio, 1 L de água e 15 g de agar. Após o preparo o meio foi autoclavado a 121°C por 20 minutos e adicionado a placas de Petri (20 mL por placa).

- Solução de ampicilina 8 mg/mL:

0,08 g de ampicilina foram dissolvidos em 10 mL de água destilada morna. A esterilização desta solução foi feita por membrana filtrante de 0,45 μm (MILLIPORE) e a mesma foi armazenada sob refrigeração em frasco escuro.

- Tampão fosfato 0,2 M pH=7,4:

Solução A

8,52 g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) foram dissolvidos em 300 mL de água destilada.

Solução B

2,39 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado ($NaH_2PO_4.H_2O$) foram dissolvidos em 100 mL de água destilada.

A solução B foi adicionada à solução A até que o pH atingisse o valor de 7,4. Em seguida, o tampão preparado foi autoclavado a 121°C por 20 minutos e armazenado à temperatura ambiente.

- Mistura S9 – 4% v/v:

Para o preparo de 100 mL de mistura S9 foram utilizados 39,5 mL de água destilada estéril, 50 mL de tampão fosfato 0,2 M, 4 mL de NADP, 0,5 mL de glicose-6- fosfato 1,0 M, 2 mL da solução de sais (KCl 1,65 M e $MgCl_2$ 0,4 M) e 4 mL de fração S9. Todos os ingredientes

foram adicionados resfriados e de maneira sequencial respeitando a ordem descrita acima. Após 3 horas a solução excedente foi descartada.

4.2.2 Ensaio de sobrevivência

O ensaio de sobrevivência foi executado para avaliar a citotoxicidade do ALPI às cepas de *Salmonella* e assim garantir que o ensaio de mutagenicidade fosse executado em uma faixa de concentração não tóxica (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Resumidamente, 10 µL da suspensão bacteriana tratada conforme descrito em Mortelmans e Zeiger (2000) foram diluídas em microtubos contendo salina 0,9% (NaCl 9 g/L), sendo realizada uma diluição seriada com concentração final de 10^{-7}. Posteriormente, 100 µL da mistura foram colocados em uma placa de Petri com meio rico e espalhada com auxílio de pérolas de vidro. Ao final as placas foram incubadas por 37ºC durante 24h, e então as unidades formadoras de colônias foram contadas. As concentrações citotóxicas foram aquelas em que a sobrevivência foi menor que 70% em relação ao controle negativo (água estéril) e que apresentaram diferenças estatísticas significativas. O experimento foi realizado em duplicata (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

4.2.3 Ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microssoma

Nesse trabalho foi utilizado o protocolo da pré-incubação conforme recomendações da OECD nº471 (OECD, 1997).

Resumidamente, 100 µL de cultura (1 x 10^9 células) de cada cepa de *S. typhimurium* (TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104), 100 µL de diferentes concentrações do ALPI (0,2; 2; 20; 200 µg/mL) e 500 µL de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,4) ou o mesmo volume da mistura S9 (metabolização exógena) foram misturadas e incubadas a 37°C por 20 minutos com agitação (150 rpm). Então, 2,0 mL de ágar de superfície foram adicionados em cada tubo e a mistura foi homogeneizada e vertida em placa de Petri contendo 2 mL de meio mínimo para cultivo. As placas foram incubadas por 72 horas em temperatura de 37°C (±0,5) e as colônias revertentes His^+ foram contadas. O teste foi realizado em triplicata. Controle negativo (água estéril) e positivos (TA97: 4-Nitroquinolina-N-Óxido 10 µg/mL; TA98 e TA100: 4-Nitroquinolina-N-Óxido 5 µg/mL; TA102: mitomicina 5 µg/mL; TA104: metilmetano sulfonato 2,5 mg/mL para os ensaios na ausência de S9 e para os ensaios na presença de S9 foi utilizado o 2-aminoantraceno 20 µg/mL para todas as cepas de *Salmonella*) foram utilizados (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

A resposta mutagênica foi considerada positiva quando apresentou valor estatisticamente significativo em relação ao controle negativo ($p < 0,05$) para a análise estática

ANOVA e Dunnett's, além de índice de mutagenicidade (IM = revertentes induzidos/revertentes espontâneos) maior ou igual a 2 (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Importante salientar que os genótipos das cepas de *S. typhimurium* foram confirmados antes dos ensaios através dos testes de auxotrofia para histidina (*his*), mutação *rfa*, mutação *uvrB* e presença dos plasmídeos pKM101 e pAQ1 (MARON; AMES, 1983; OECD, 1997).

Todas as cepas bacterianas usadas neste trabalho são provenientes do Laboratório de Mutagênese Ambiental, coordenado pelo professor Dr. Israel Felzenszwalb, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, onde foram executados os ensaios.

4.3 Ensaios de viabilidade celular

4.3.1 Cultivo e manutenção das células HepG2

a) Preparo do Meio de Cultura

A quantidade de 9,61 g de *Dulbecco's Modified Eagle's Médium* (DMEM) foi dissolvida em 800 mL de água destilada sob agitação constante em béquer. Em seguida, 3,7 g de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) e 10 mL de penincilina (10.000 unidades) e estreptomicina (10 mg/mL) foram adicionados à solução e o volume final avolumado para 1 L com água destilada. Corrigiu-se o pH para 7,2 com hidróxido de sódio ou acido clorídrico, ambos 0,1 M, e esterilizou-se a solução por filtração em membrana 0,22 μm. O meio foi armazenado em frasco esterilizado na geladeira.

b) Meio de Cultivo suplementado

O meio de cultivo foi preparado a partir da solução de meio de cultura descrita no item anterior com a adição de 10% de soro fetal bovino (SFB).

c) Tampão fosfato- salino (PBS)

Em béquer de 1 L foram dissolvidos 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 0,2 g de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4), 8,0 g de cloreto de sódio (NaCl) e 11,15 g de fosfato dibásico de sódio anidro (Na_2HPO_4) em água destilada q.s.p. 1000 mL sob agitação constante, até a completa solubilização. O pH foi corrigido para 7,4 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico a usualmente 0,1 M. A esterilização foi realizada por autoclave a 120°C por 30 minutos. Após o preparo dessa solução, diluiu-se 100 mL em 900 mL de água destilada estéril para se obter o PBS 1x que foi utilizado durante os experimentos com célula HepG2.

4.3.1.1 Descongelamento de células HepG2

As células HepG2, armazenadas em tubos criogênicos estéreis, foram retiradas do nitrogênio líquido e após o tempo de espera de descongelamento, todo o conteúdo do tubo

criogênico foi transferido para um tubo de fundo cônico com 9 mL de meio de cultivo. Em seguida, as células homogeneizadas foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspendido com 1 mL de meio de cultivo. As células foram transferidas para um frasco de cultura de 75 cm^2 contendo 14 mL de meio de cultivo. Ao final desse processo, o frasco de cultura contendo as células foi armazenado em estufa a 37°C com 5% de CO_2.

4.3.1.2 Repique e manutenção das células HepG2

Todo o meio de cultivo presente no frasco de cultivo celular foi descartado e as células lavadas com PBS (10 mL para o frasco de cultura de 75 cm^2 e 15 mL para os de 150 cm^2). Em seguida, adicionou-se tripsina (frascos de cultura de 75 cm^2 colocavam-se 5 mL e nos de 150 cm^2 10 mL de tripsina), que ficou em contato com as células na estufa a 37ºC por 5 minutos. Findado esse tempo, toda solução foi transferida para um tubo de fundo cônico estéril e centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspendido com 1,0 mL de meio para cultura. Em seguida, 0,5 mL da suspensão de células foram colocados em dois frascos de cultura de 75 cm^2 contendo 14,5 mL de meio completo em cada um. Os frascos foram colocados na estufa a 37ºC com 5 % de CO_2.

4.3.1.3 Congelamento das células HepG2

O congelamento foi realizado da mesma maneira que o repique, exceto na solubilização do *pellet*, onde foi usada solução de 95% de meio próprio (DMEM com 10% de SFB) e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), com volume calculado de forma que a suspensão de células a ser congelada estivesse na concentração de 10^6 a 10^7 células por mL. O conteúdo total de células solubilizado foi dividido em tubos criogênicos, cada um contendo 1 mL, e armazenados por 15 min em geladeira. Findado esse tempo, ficaram 2 horas no vapor de nitrogênio e depois foram armazenados em nitrogênio líquido.

4.3.2 Contagem das células para ensaio

Após a tripsinização e centrifugação, o *pellet* foi ressuspendido em 1 mL de meio de cultura. Em seguida, 10 µL da suspensão de células foram misturados a 90 µL de corante *Trypan Blue* (diluição 1:10) e as células foram contadas em câmara de Neubauer.

4.3.3 Ensaio WST-1

Essa análise foi feita de acordo com as recomendações do kit. Resumidamente, $2x10^4$ células foram plaqueadas em cada poço de uma placa de 96 poços e após os intervalos de

exposição (24, 48 e 72 horas) a diferentes concentrações do ALPI, foram adicionados 10 µL da solução de WST-1 às células e estas foram mantidas a 37°C e 5% CO_2 por 3 horas.

A quantificação das variações colorimétricas foi realizada em leitor de microplaca (µ-Quant, Bio-tek Instruments INC) utilizando-se o comprimento de onda de 450 nm. A porcentagem das células viáveis foi determinada pela razão da absorbância obtida das culturas tratadas em relação às não tratadas, assumindo o controle negativo (água estéril) como 100% de viabilidade.

4.3.4 Ensaio LDH

Essa análise foi realizada de acordo com as recomendações do kit. Resumidamente, $2x10^4$ células foram plaqueadas em cada poço de uma placa de 96 poços e após os intervalos de exposição (24, 48 e 72 horas) a diferentes concentrações do ALPI, 100 µL do sobrenadante de cada triplicata foram transferidos para uma nova placa de 96 poços e então foram adicionados 100 µL da solução constituída por 2,5 µL do catalisador (Diaphorase/NAD+) e 112,5 µL da solução de corante (INT – *iodotetrazolium chloride* e lactato de sódio) em cada poço, e estas placas foram mantidas durante 15 min embrulhadas em papel alumínio em temperatura ambiente. Ao fim desse período, a absorbância foi lida no leitor de microplaca a 492 nm. O percentual de células mortas foi verificado pela razão da absorbância obtida das culturas tratadas em relação às não tratadas, admitindo o controle negativo (água estéril) como 100% de viabilidade.

4.4 Ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese (MNBC)

O ensaio foi executado de acordo com as recomendações da OECD 487 (2016) com algumas adaptações de Fenech (2000). Resumidamente, $3x10^4$ células HepG2 foram semeadas em cada poço de uma placa de 96 poços e incubadas na presença e na ausência de diferentes concentrações do ALPI . Após 3h de tratamento em estufa a 37°C com 5% de CO_2, foi adicionada citocalasina B (3 µg/mL) por 24h. Posteriormente as células foram fixadas (metanol [3]: ácido acético [1]) e coradas com uma solução de 1:5 Giemsa: água destilada. Em seguida, as células foram analisadas no microscópio ocular usando a objetiva de 40X. Foram analisadas 1000 células por poço (3000 células por concentração) (FENECH, 2000; FENECH; CROTT, 2002; OECD, 2014).

O cálculo para análise de micronúcleos leva em consideração um total de 1000 células binucleadas, como mostrado na equação 1.

Equação 1- Cálculo da frequência de micronúcleo em células binucleadas

$$\textbf{Frequência de micronúcleo} = \frac{\textbf{(N.º de micronúcelos em 1000 células binucleadas)}}{\textbf{(1000 células binucleadas)}}$$

Adaptado de (FENECH, 2007)

Além da análise de micronúcleo, foi realizada a análise de avaliação de citotoxicidade baseada no índice de proliferação de bloqueio da citocinese (IPBC) e índice de replicação (IR) utilizando a contagem de 500 células (FENECH; CROTT, 2002; OECD, 2014). As equações estão descritas abaixo (equação 2 e 3).

Equação 2- Cálculo do índice de proliferação de bloqueio da citocinese

$$\textbf{IPBC} = \frac{\textbf{(N.º de células mononucleadas) + (2x N.º de células binucleadas) + (3x N. º de células polinucleadas)}}{\textbf{(N.º total de células)}}$$

Adaptado de (FENECH, 2007)

Equação 3. Cálculo do índice de replicação

$$\textbf{IR} = \frac{\textbf{((N.º de células binucleadas) + 2x (N.º de células multinucleadas)) ÷ (N.º Total de células)}_{\textbf{Tratadas}}}{\textbf{((N.º de células binucleadas) + 2x (N.º de células multinucleadas)) ÷ (N.º Total de células)}_{\textbf{Controle}}}$$

Adaptado de (FENECH, 2007)

No cálculo de IPBC o valor será 1 se todas as células viáveis contadas forem mononucleadas, o que indica ausência de divisão durante o período de bloqueio de citocinese. Por outro lado, o valor 2 indica que todas as células completaram uma divisão, >2 que um determinado número sofreu mais que uma divisão (FENECH, 2007; FELLOWS *et al.*, 2008).

No cálculo de IR o valor obtido está relacionado com o número relativo de ciclos celulares por célula durante o período de exposição, logo quanto maior esse valor, menor o potencial citostático do composto em análise (FENECH, 2007).

4.5 Análise estatística

Os resultados gerados foram comparados com os valores do controle negativo usando one way ANOVA com o Dunnett's. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0{,}05$.

5. RESULTADOS

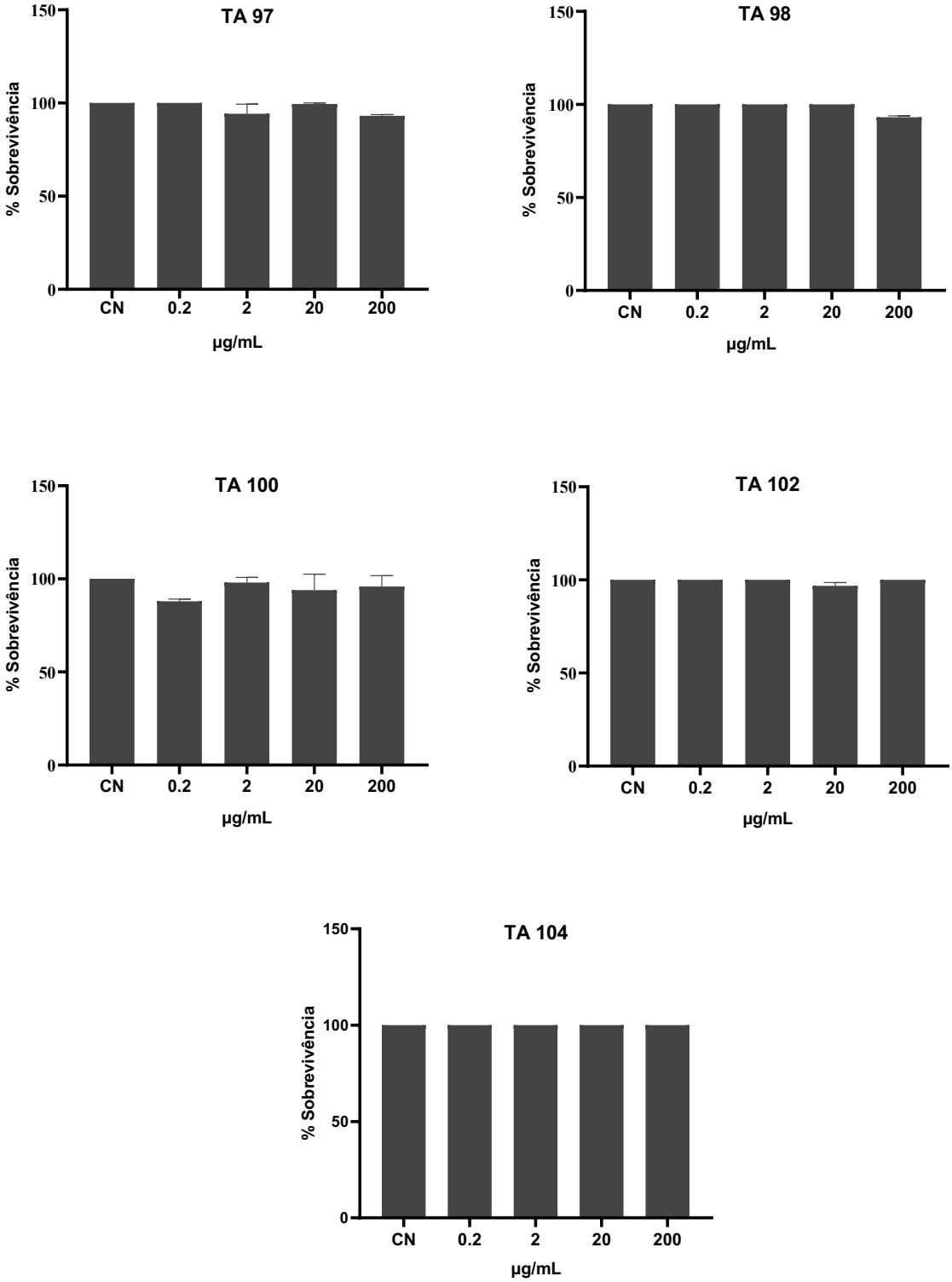
5.1 Ensaios com *Salmonella enterica sorovar typhimurium*

Foram realizados os ensaios de sobrevivência e de mutagenicidade utilizando as cepas TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104 de *Salmonella enterica sorovar typhimurium.*

5.1.1 Ensaio de sobrevivência

Os resultados mostrados na figura 8 indicam que o dietilfosfinato de alumínio não reduziu significativamente o percentual de sobrevivência das cinco cepas utilizadas nesse estudo quando comparado ao controle negativo (água estéril), o que garantiu que o ensaio de mutagenicidade pudesse ser feito usando essas mesmas concentrações em uma faixa não tóxica.

Figura 8- Percentual de sobrevivência celular para as cepas TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104 de *Salmonella enterica sorovar typhimurium* após 24h de exposição a diferentes concentrações de dietilfosfinato de alumínio (ALPI) CN:Água estéril. *p<0.05 por One-way ANOVA e Dunnett's.

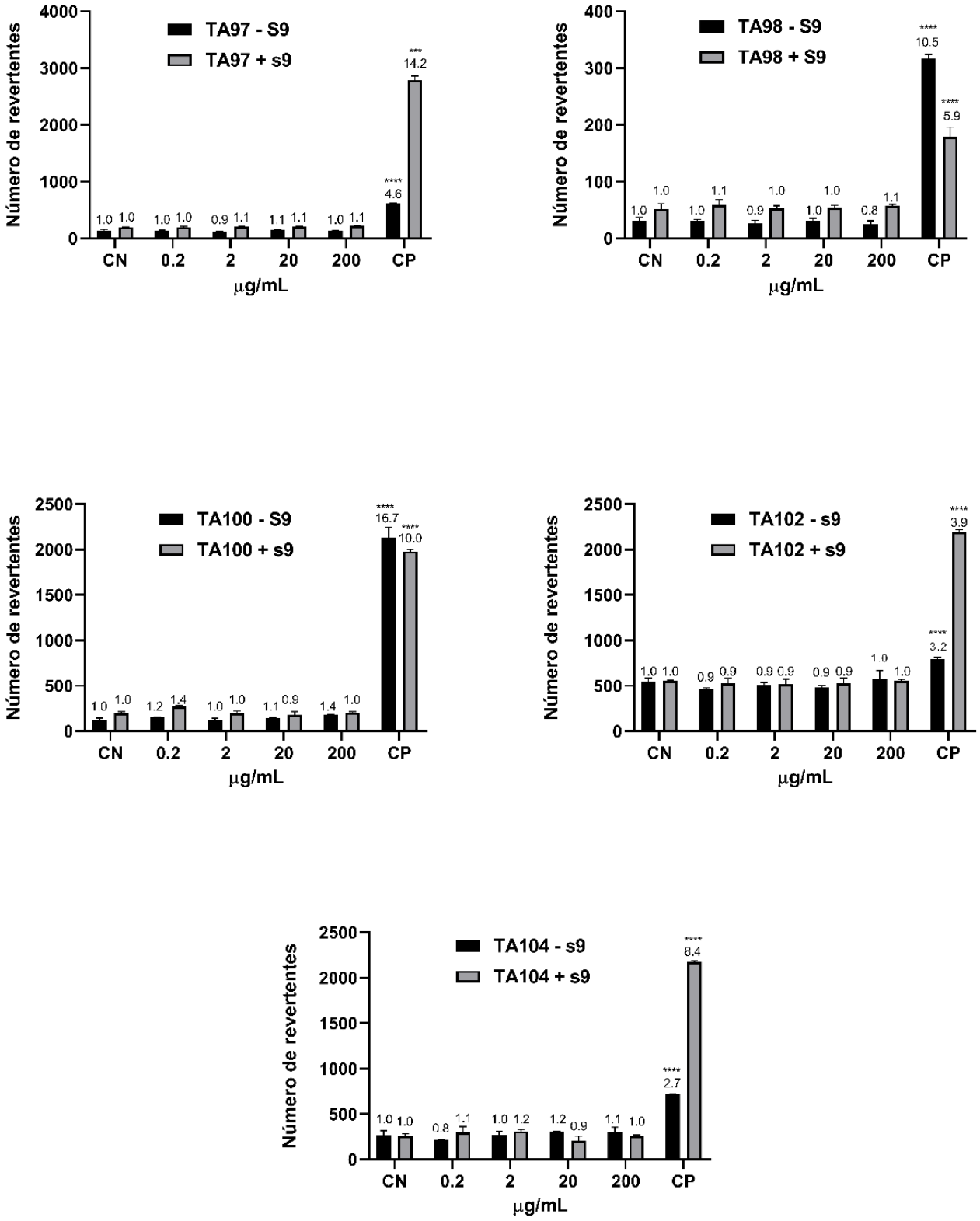


5.1.2 Ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microssoma

Os resultados do ensaio *Salmonella*/microssoma estão expressos como índice de mutagenicidade (IM). A figura 9 apresenta os gráficos do ensaio de mutagenicidade na ausência e presença de metabolização exógena (S9).

Esse ensaio mostrou que o ALPI assim como seus produtos de biotransformação não induziram mutagenicidade nas concentrações testadas nas cepas TA97 e TA98 pela adição ou deleção do par de bases C:G e nem as cepas TA98, TA100, TA102 e TA104 pela substituição de G:C para A:T ou A:T para G:C. Todas as cepas tiveram IM menor que 2 e nenhuma apresentou diferença estatística em relação ao controle.

Figura 9- Número de revertentes das cepas TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104 após exposição ao dietilfosfinato de alumínio na ausência e presença de metabolização exógena. Números acima das barras correspondem ao Índice de Mutagenicidade (IM). CN(controle negativo): Água estéril; CP (controle positivo) para ensaio sem S9: 4-Nitroquinolina-N-Óxido 10 µg/mL (TA97), 4-Nitroquinolina-N-Óxido 5 µg/mL (TA98 e TA100), Mitomicina 5 µg/mL (TA102) e metilmetano sulfonato 2,5mg/mL (TA104), respectivamente. CP (controle positivo) para ensaio com S9: 2- aminoantraceno 20 µg/mL *p<0.05 por One-way ANOVA e Dunnett's.



5.2 Ensaio WST-1

O ensaio do WST-1 foi utilizado para avaliar a viabilidade das células HepG2 após exposição ao ALPI, tendo como *endpoint* a interferência na atividade das desidrogenases mitocondriais.

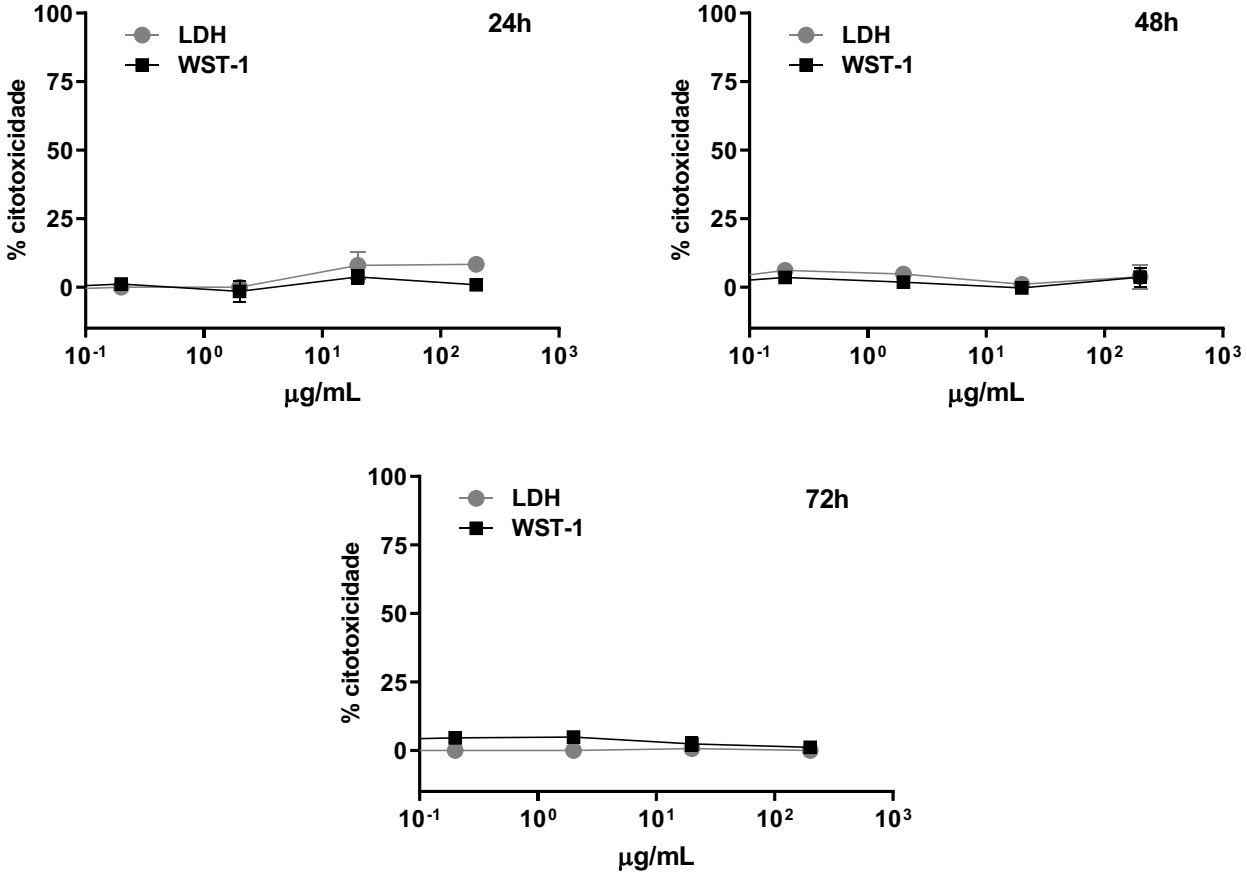
O ALPI não apresentou redução estatisticamente significativa do percentual de viabilidade celular no modelo em estudo em nenhuma das concentrações testadas nos três períodos de incubação (24, 48 e 72 h) em comparação ao CN (figura 10).

5.3 Ensaio LDH

Além do ensaio de WST-1, pesquisou-se efeito citotóxico do ALPI através do ensaio de LDH, que mede morte celular por meio de alteração na integridade da membrana plasmática (figura 10).

O ALPI não exibiu aumento estatístico significativo do percentual de morte celular por alteração da membrana plasmática em nenhuma das concentrações testadas nos três períodos de incubação quando comparado ao CN.

Figura 10- Percentual de morte celular baseado na interferência na atividade de desidrogenases mitocondriais (quadrado preto, WST-1) e na ruptura da integridade da membrana plasmática (circulo cinza, LDH) das células HepG2 após 24h, 48h e 72h de exposição a diferentes concentrações de dietilfosfinato de alumínio. CN: Água estéril. CP: Triton X-100 5% .*p<0.05 por One-way ANOVA e Dunnett's.

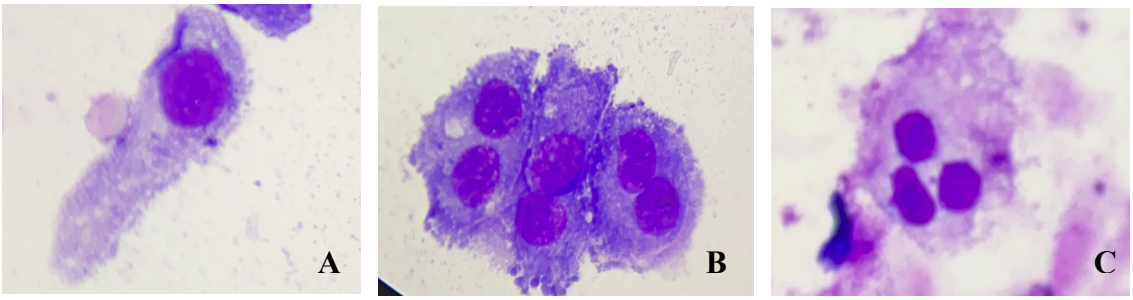


Os dados obtidos nos dois ensaios de citotoxicidade (WST-1 e LDH) mostram que o composto não é capaz de induzir morte celular nem por alteração da atividade das desidrogenases mitocondrias e nem por alteração da membrana celular, indicando que o ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese (MNBC), que é um teste de genotoxicidade, pode ser realizado em uma faixa não tóxica nessas mesmas concentrações.

5.4 Ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese (MNBC)

O ensaio de MN foi utilizado para avaliar o potencial genotóxico do ALPI às células HepG2 após três horas de exposição. As concentrações usadas foram as mesmas avaliadas nos ensaios de viabilidade. A contagem de células mononucleadas, binucleadas e polinucleadas, (figura 11) foi utilizada para calcular o IPBC.

Figura 11-. Imagens de células mononucleadas (A) binucleadas(B), polinucleadas- três ou mais núcleos (C) vistas com objetiva de 40x após bloqueio por citocalasina



Fonte: Elaborada pelo autor

A tabela 1 exibe valores de IPBC acima de 1,6 para todas as concentrações em estudo e os controles (positivo e negativo). Esses dados são úteis para indicar que a maioria das células sofreu pelo menos uma divisão na presença do composto.

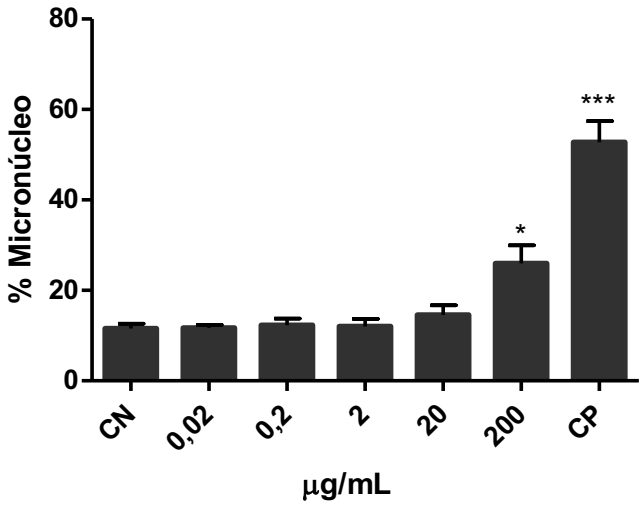
Tabela 1. Avaliação da citotoxicidade do dietilfosfinato de alumínio (ALPI) em células HepG2

Concentração µg/mL	IPBC	IR (%)	% Citostático
Controle negativo	1,90 ± 0,118	–	–
0,02	1,77 ± 0,08	85,49	14,51
0,2	1,80 ± 0,1	88,72	11,28
2	1,68 ± 0,28	75,3	24,7
20	1,73 ± 0,01	80,83	19,17
200	1,79 ± 0,1	88,06	11,94
Controle positivo	1,89 ± 0,05	99	1

IPBC: índice de proliferação de bloqueio da citocinese

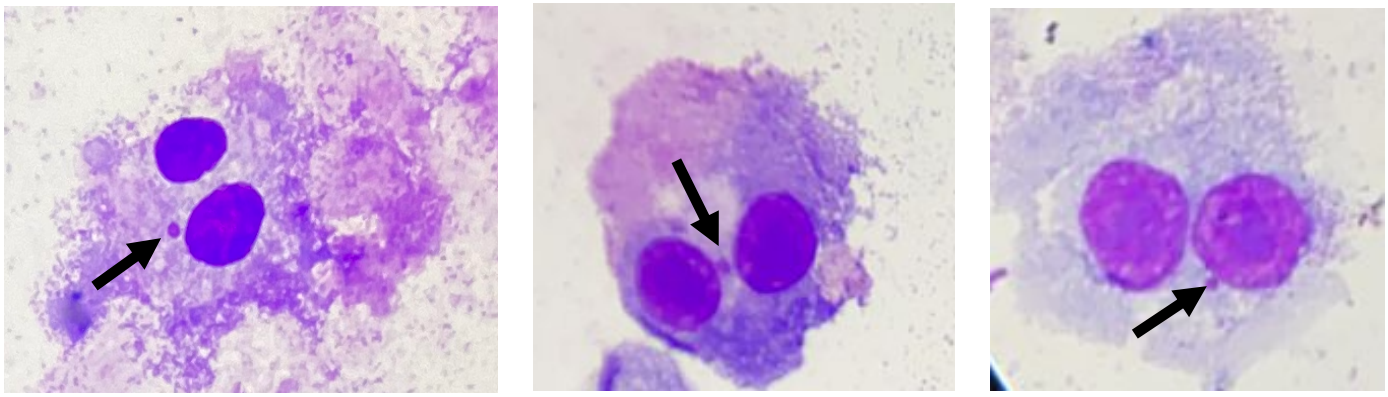
A figura 12 mostra a frequência de micronúcleos induzidos pelo ALPI em células HepG2. É possível observar relação dose resposta nas três maiores concentrações (2, 20 e 200 µg/mL) de ALPI, sendo a concentração de 200 µg/mL diferente estatisticamente do CN e por isso genotóxica em HepG2 nesse modelo experimental.

Figura 12- Percentual de micronúcelos em células HepG2 binucleadas após exposição ao dietilfosfinato de alumínio em diferentes concentrações. CN (controle negativo): Água destilada estéril; CP (controle positivo):Benzo-α-pireno 0,1 mg/mL. *p<0.05 por One-way ANOVA e Dunnett's.



A figura 13 mostra algumas imagens das células HepG2 binucleadas com micronúcleos obtidas desse trabalho.

Figura 13- Células binucleadas com micronúcleos vistas pela objetiva de 40x após bloqueio por citocalasina.



Fonte: Elaborada pelo autor

6. DISCUSSÃO

Devido à necessidade do uso de retardantes de chama para prevenção de incêndios por ações físicas ou químicas, eles são aplicados em diversos materiais, desde produtos eletrônicos até têxteis, podendo estar em contato direto com os seres vivos seja durante o seu manuseio e uso ou pelo seu descarte no meio ambiente. Por isso, não basta apenas proibir aqueles que se mostraram tóxicos aos seres humanos e ao meio ambiente, mas em conjunto desenvolver substitutos de menor toxicidade. No entanto, essas novas substâncias precisam ser estudadas antes de se acharem disponíveis no mercado, o que não vem acontecendo (WAAIJERS *et al.*, 2013a).

Sabendo-se da necessidade de pesquisas envolvendo esses compostos e o crescimento do uso de metodologias alternativas com o desenvolvimento do programa 3Rs (reduzir, reutilizar e substituir) no final da década de 50, esse trabalho utilizou ensaios *in vitro* para estudo da toxicidade do ALPI (RUSSELL; BURCH, 1959). A literatura mostra que esses ensaios podem ser aplicados para o entendimento de ações de substâncias previamente aos organismos vivos (EISENBRAND *et al.*, 2002), além de apresentarem menor custo e resultados mais rápidos sem o uso de animais (ANADÓN *et al.*, 2014; GÓMEZ LECHÓN; TOLOSA; DONATO, 2014).

No presente estudo, tendo em vista a ausência de indução de citotoxicidade do ALPI às cepas de *Salmonella enterica sorovar typhimurium*, como mostrado na fig.8 pode-se afirmar que o ensaio de mutagenicidade foi realizado em uma faixa não tóxica (viabilidade superior a 70%), não dando margem a resultados falsos negativos.

O ensaio de *Salmonella*/microssoma é muito empregado para o estudo de mutações pontuais de compostos utilizados em diversas áreas, uma vez que respostas mutagênicas obtidas nesse ensaio tem elevada relação com carcinogenicidade em roedores. Sua importância o tornou parte dos ensaios recomendados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (FDA, 2012, MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Devido a essas vantagens, esse ensaio foi escolhido para estudar indução de mutagenicidade pelo ALPI.

Os dados mostrados na figura 9 com as cinco cepas de *Salmonella* constatam que o dietilfosfinato de alumínio assim como seus produtos de biotransformação não induzem mutação de ponto, nem por deslocamento do quadro de leitura do DNA nem por substituição de pares de bases (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Não existem dados até o momento publicados na literatura com ALPI para que possa ser feita a comparação dos resultados do ensaio *Salmonella*/microssoma. Entretanto, um relatório da *Environmental Protection Agency* (EPA) de 2014 mostra, de acordo com estudos confidenciais, que esse composto não é capaz de causar mutações nas cepas TA1535, TA1537, TA98 e TA100 de *Salmonella enterica*

sorovar typhimurium com e sem ativação metabólica e nem aberrações cromossômicas em modelos *in vitro* e *in vitro,* sendo por isso considerado com potencial genotóxico baixo (U.S.EPA, 2014).

Resultados semelhantes de mutagenicidade para retardantes de chama organofosforados foram encontrados por Föllmann e Wober (2005). No referido estudo, o tris-(2-cloroetil)-fosfato (TCEP) e o tris-(2-cloropropil)-fosfato (TCPP), dois compostos organofosforados halogenados, não mostraram atividade mutagênica no ensaio *Salmonella*/microssoma com e sem ativação exógena S9 em oito cepas (TA97, TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535, TA1537 e TA1538) (FÖLLMANN; WOBER, 2006).

Os ensaios de citotoxicidade são úteis para indicar a faixa de concentração não tóxica a ser utilizada nos ensaios subsequentes, assim como os possíveis alvos de toxicidades de agentes tóxicos (EISENBRAND; POOL-ZOBEL; BAKER; BALLS *et al.*, 2002). Nos ensaios de WST-1 e LDH o ALPI não mostrou capacidade de induzir toxicidade pela alteração da atividade de desidrogenases mitocondriais ou alteração da integridade da membrana plasmática em células HepG2 nas cinco concentrações estudadas após 24, 48 e 72 horas de exposição, como mostrado nas fig.10.

Corroborando com os ensaios de viabilidade desse trabalho, Hendriks e colaboradores (2014) compararam HFFR com retardantes bromados e mostraram que o ALPI não apresentou citotoxicidade em modelo celular PC12 e B35, células de feocromocitoma e neuroblastoma de rato. Devido ao resultado em células B35 foi classificado com potencial neurotóxico insignificante (HENDRIKS *et al.*, 2014).

Outros retardantes de chama livres de halogênio foram estudados nessa mesma pesquisa, no entanto, apenas três não mostraram efeito neurotóxico (LOEC ≥ 10 μM) - ALPI, BPS (poliestireno bromado) e BDP (Bisfenol A bis difenil fosfato). Os demais, incluindo os bromados, mostraram baixo potencial neurotóxico (1 μM ≤ LOEC < 10 μM) - éter decabromodifenílico (BDE-209), resorcinol bis difenilfosfato (RDP), 9,10- diidro-9-oxa-10-fosfafenantreno- 10-óxido (DOPO), polifosfato de amônio (APP), trióxido de antimônio (ATO), hidróxido de magnésio (MHO)- e potencial neurotóxico moderado a alto(0,1 μM ≤ LOEC < 1 e LOEC< 0,1 μM, respectivamente) - trifenilfosfato (TPP), tetrabromobisfenol A (TBBPA) trihidróxido de alumínio (ATH), hidróxido estanato de zinco (ZHS), estanato de zinco (ZS), montmorilonita (MMT) e polifosfato de melanina (MPP). Esse trabalho evidenciou a necessidade de mais estudos dos HFFR para confirmar o baixo risco à saúde humana e o meio ambiente, para então serem substituintes seguros dos retardantes de chama halogenados (HENDRIKS *et al.*, 2014).

Sendo assim, considerando a toxicidade do ALPI a outros organismos, esse composto tem mostrado toxicidade baixa a moderada. Estudos em modelos *in vivo* tem sido realizados

também a fim de constatar a segurança do ALPI. Foi mostrado que esse retardante bem como o metiletilfosfinato de alumínio, possuem capacidade de causar hepatoxicidade leve e toxicidade reprodutiva observada pela redução da contagem de esperma em camundongos machos BALB/C (BAO *et al.*, 2017).

Em estudos realizados em *Daphnia magna* para vários retardantes de chama livres de halogênios, mostraram que o ALPI apresenta baixa toxicidade aguda para essa espécie (concentração da amostra responsável pelo efeito em 50% dos organismos testados - CE50 > 10 mg/L) em um período de 48h, e moderada toxicidade crônica (CE50 de 3,2 mg/L) em um período de 21 dias (WAAIJERS *et al.*, 2013b; WAAIJERS *et al.*, 2013c).

Em outro estudo de toxicidade comparando congêneres de éteres difenílicos bromados (BDE)- 2,2 ′, 4,4′-tetrabromodifenil éter (BDE-47), 2,2 ′, 4,4 ′, 5-pentabromodifenil éter (BDE-99) e 2,2 ′, 4,4 ′, 5,6′-hexabromodifenil éter (BDE-154)- com o ALPI mostrou que o BDE-47 foi capaz de alterar o desenvolvimento embrionário da larva induzindo edemas no pericárdio e saco vitelíneo em modelo zebrafish. Em contrapartida, o ALPI não gerou alterações morfológicas no desenvolvimento desse modelo animal nas concentrações testadas (0,003- 30 mg/L) e foi considerado uma alternativa mais segura em relação ao uso do BDE-47. Os outros congêneres desse retardante de chama bromado não apresentaram alterações tóxicas significativas nesse estudo (ABE *et al.*, 2021).

Outros retardantes de chama livres de halogénio tem mostrado comportamentos tóxicos diferentes do ALPI. Investigações *in vivo* em modelo animal zebrafish mostraram que o trifenil fosfato causou toxicidade no desenvolvimento das larvas observado por aumento na taxa de malformações e atraso no tempo de eclosão da larva na menor e maior dose exposta, respectivamente. Além de causar, na maior dose exposta, alteração na expressão de proteínas oculares importantes para a função visual bem como desorganização da função muscular (SHI *et al.*, 2019).

Outros estudos utilizando zebrafish e camundongos mostraram que alguns HFFR induziram efeitos cardiotóxicos e hepatotóxicos (ALZUALDE *et al.*, 2018; BAO *et al.*, 2017); e um estudo *in vitro* mostrou potencial dos ésteres de fosfatos e/ou fosfonatos para atuarem como interferentes endócrinos (KOJIMA *et al.*, 2013).

Embora se tenha grandes expectativas para HFFR em relação à substituição dos retardantes de chama bromados, estudos já mostram detecções deles em ambientes internos de casas e meios de transporte (ALI *et al.*, 2013; HAO *et al.*, 2018), além de águas superficiais, residuais e potáveis (HAO *et al.*, 2018;KIM; KANNAN, 2018).

Os dados sobre a exposição ambiental ou ocupacional ao ALPI publicados na literatura são escassos, e não se pode afirmar se tem uma distribuição significativa em ambientes internos e na biota. No entanto, um estudo publicado em 2014 mostrou a ocorrência de

dialquilfosfinatos, entre eles o ALPI, e seu respectivo hidrolisado (ácido dietilfosfínico) em amostras de sedimentos retiradas de uma planta fabril após um ano e meio da parada de descartes desses materiais, sendo sugerido ainda pelos pesquisadores que, devido a alta mobilidade vertical desses compostos e seus hidrolisados (ácidos dialquilfosfínicos) em sedimentos e solos bem como a alta hidrólise em ácidos fosfínicos (até 49.6%), estes poderiam contaminar águas subterrâneas (NIU *et al.*, 2014). O relatório da agência de proteção ambiental (EPA) 2016 relacionou o ALPI à alta persistência devido à presença de alumínio, que é um metal e, portanto, não sofre biodegradação (LASSEN et al., 2016).

As propriedades (neuro)tóxicas do alumínio como deposição de β- amiloide, estresse oxidativo, produção de espécies radicalares de oxigênio (ROS) e alteração no equilíbrio do cálcio estão bem descritas na literatura (HU *et al.*, 2007; SHARMA; WAKODE *et al.*, 2020), entretanto acredita-se que a quantidade desse metal presente no ALPI é muito pequena para gerar preocupações à saúde em casos de dissociação do retardante de chama (HENDRIKS *et al.*, 2014).

Outro aspecto importante para o estudo toxicológico do ALPI inclui a pesquisa de genotoxicidade. O ensaio de MN para verificar danos ao DNA por agentes genotóxicos em modelo celular HepG2 se mostrou mais sensível do que o ensaio de cometa, mostrando que o ensaio e o modelo celular escolhido são adequados para avaliar se o composto ALPI é capaz de gerar genotoxicidade *in vitro* (VALENTIN-SEVERIN *et al.*, 2003).

Como mostrado na figura 12 a maior concentração (200 μg/mL) de ALPI estudada nesse trabalho apresentou diferença significativa na frequência de micronúcleos em células HepG2 em relação ao controle negativo após 3h de exposição, o que indica dano aos cromossomos por efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos - efeitos irreversíveis. As demais concentrações não mostraram diferença estatisticamente significativa na frequência de micronúcleos nas células, indicando que nessas condições de exposição o composto em estudo não resultou em aumento significativo de danos em cromossomos.

Os dados de IPBC, tabela 1, mostram que a maior parte das células completaram pelo menos 1 divisão, o que é importante para a observação dos micronúcleos. O resultado do índice de replicação aponta para percentual citostático variando entre 11,28- 24,7%.

Esse resultado é importante uma vez que a grande maioria dos tumores está relacionada à instabilidade cromossômica, na qual pode ser observada formação de micronúcleos (FENECH; CROTT, 2002). Somado a isso, existem trabalhos que relacionam a frequência de micronúcleos, após a exposição a determinados xenobióticos, com o risco de câncer. Entre esses, tem-se um estudo publicado em 2019 que analisou, dentre outros danos, a genotoxicidade do produto do escapamento do motor a diesel (DDE) em mecânicos expostos e não exposto a esse poluente. O DDE é formado por gases tóxicos, hidrocarbonetos aromáticos e partículas

que atingem o parênquima pulmonar, já sendo reconhecido como cancerígeno. O ensaio de MN com bloqueio de citocinese em linfócitos e células bucais mostrou aumento na frequência de micronúcleos na população de estudo exposta a esse carcinógeno, sendo esse teste e o ensaio de cometa tidos como útil para o biomonitoramento de humanos e avaliação do risco de câncer na população exposta a esse agente (LEÓN-MEJÍA *et al.*, 2019).

Outro estudo relaciona a exposição ocupacional de trabalhadores de um laboratório de anatomia ao formaldeído, carcinógeno, com o aumento da frequência de micronúcleo em células esfoliadas bucais e linfócitos (COSTA *et al.*, 2019).

Algumas pesquisas também apontam para níveis aumentados de micronúcleos em linfócitos de pacientes com câncer de mama, útero e faringe (MILOSEVIĆ-DJORDJEVIĆ *et al.,* 2010), pescoço e cabeça (GEORGE *et al.*, 2014) e também em células bucais de pacientes com câncer oral (KATARKAR *et al.*, 2014).

Não existem dados publicados na literatura sobre a avaliação do perfil de genotoxicidade do ALPI, no entanto, conforme relatado anteriormente, um relatório da EPA categoriza esse composto como sendo de baixa genotoxicidade (US EPA, 2014).

Diferente do resultado observado nesse trabalho, um estudo com seis PBDEs - éter tetrabromodifenílico (BDE-47), éter pentabromodifenílico (BDE-99 e BDE-100), éter hexabromodifenílico (BDE-153 e BDE-154) e éter decabromodifenílico (BDE-209) - mostrou que nenhum dos compostos apresentou aumento significativo na frequência de micronúcleos e nem de efeitos citotóxicos determinados pelo IPBC. Por outro lado, todos eles apresentaram genotoxicidade no ensaio de cometa, ou seja, foram capazes de causar danos reversíveis ao DNA (PEREIRA *et al.*, 2016). Da mesma forma, BDE-209 não mostrou aberrações cromossômicas no ensaio de micronúcleo e apresentou genotoxicidade no ensaio de cometa (RIVA *et al.*, 2007).

O presente estudo apresentou por limitações a baixa solubilidade do ALPI em água, apesar de seu baixo valor de Kow, e a carência de informações na literatura sobre esse composto.

7. CONCLUSÃO

O dietilfosfinato de alumínio bem como seus produtos de biotransformação não se mostraram mutagênicos após avaliação pelo ensaio *Salmonella*/microssoma. Esse composto também não foi capaz de causar morte celular em células HepG2, seja por interferência na atividade de desidrogenases mitocondriais ou por ruptura da membrana plasmática. No entanto, o ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese apontou para genotoxicidade na maior concentração (200 μg/mL) do ALPI em células HepG2.

Baseando-se nos resultados obtidos, pode-se concluir que esse trabalho foi capaz de fornecer dados sobre o perfil de toxicidade do ALPI *in vitro* e contribuir para os estudos de toxicidade humana. Além de evidenciar a necessidade de mais estudos dos HFFR, nesse caso o ALPI, para confirmar o baixo risco à saúde humana e ao meio ambiente, para então serem substituintes seguros dos retardantes de chama halogenados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F. V. R.; OLIVEIRA, A. A. S. D.; MARINO, R. V.; RIALTO, T. C. R. *et al.* A comparison of developmental toxicity of brominated and halogen-free flame retardant on zebrafish. **Ecotoxicology and Environmental Safety,** v.208, p.111745, 2021.

AERTS, R.; OVERMEIRE, I. V.; COLLES, A.; ANDJELKOVIĆ, M. *et al.* Determinants of persistent organic pollutant (POP) concentrations in human breast milk of a cross-sectional sample of primiparous mothers in Belgium. **Environment international**, v.131, p.104979, 2019.

ALAEE, M.; ARIAS, P.; SJODIN, A.; BERGMAN, A. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. **Environ Int**, v.29, n.6, p.683-689, 2003.

ALHARBI, O. M. L.; BASHEER, A. A.; KHATTAB, R. A.; ALI, I. Health and environmental effects of persistent organic pollutants. **Journal of Molecular Liquids**, v.263, p.442–453, 2018.

ALI, N.; ALI, L.; MEHDI, T.; DIRTU, A. C. *et al.* Levels and profiles of organochlorines and flame retardants in car and house dust from Kuwait and Pakistan: implication for human exposure via dust ingestion. **Environment International**, v.55, p.62-70, May 2013.

ALZUALDE, A.; BEHL, M.; SIPES, N. S.; HSIEH, J. H. *et al.* Toxicity profiling of flame retardants in zebrafish embryos using a battery of assays for developmental toxicity, neurotoxicity, cardiotoxicity and hepatotoxicity toward human relevance. **Neurotoxicol Teratology**, v.70, p.40-50, 2018.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ, M. A.; CASTELLANO, V.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R. The role of in vitro methods as alternatives to animals in toxicity testing. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v.10, n.1, p.67-79, 2014.

ATCC- American Type Culture Collection. HepG2. Disponível em: < https://www.atcc.org/products/hb-8065>. Acesso em: 6 agos. 2021.

BAO, J.; LIU, Y.; LI, L.; CHEN, M. *et al.* Biological effects of new-generation dialkyl phosphinate flame retardants and their hydrolysates in BALB/C mice. **Environmental Toxicology**, v.32, n.5, p.1578-1586, 2017.

BRASIL. Portaria Interministerial n° 19, 29 de jan. 1981. Proíbe, em todo o território Nacional, a implantação de processos que tenham como finalidade principal a produção de bifenil policlorados - PCB's. Brasília, DF: Ministério do interior, 1981. Disponível em: http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/bra15389.pdf. Acessado em: http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/bra15389.pdf.

BRASIL. Projeto de lei do Senado Federal nº 173, 2009, proposto pelo senador João Tenório. Estabelece prazo para que computadores, componentes de computadores e equipamentos de informática em geral, comercializados no Brasil, atendam a requisitos ambientais e de eficiência energética. Brasília, DF: Senado Federal, 2009. Disponível em: < https://legis.senado.leg.br/sdlegetter/documento?dm=4455422&ts=1630424171000&disposition=inline>. Acesso em:<4 nov. 2021 >.

BRASIL. Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Dispõe sobre a composição do conselho nacional de controle de experimentação animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu

funcionamento e sua secretaria-executiva, cria o cadastro das instituições de uso científico de animais - ciuca, mediante a regulamentação da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. **Diário Oficial da união:** seção 1. Brasília, DF, ano 122, p. 2.

BRASIL. Instrução Normativa nº 01, de 19 de janeiro de 2010. MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, O. E. G. 2010.

BRASIL. Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais. Revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**: seção 1. Brasília, DF, ano 120, p. 1.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Portaria nº 491, de 3 de julho de 2012. Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos - Renama e sua estrutura no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI, que será supervisionada por um Conselho Diretor. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**: seção 1. Brasília, DF, ano 129, p. 19.

CLARIANT; TOXSERVICES. Aluminum Diethylphosphinate (CAS #225789-38-8) GreenScreen ® for Safer Chemicals (GreenScreen ®) Assessment Washington, D.C.: CPA (Clean Production Action). 2016.

CLAXTON, L.; ALLEN, J.; AULETTA, A.; MORTELMANS, K. *et al.* Guide for the *Salmonella* Typhimurium/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. **Mutation research**, v.189, n.2, p. 83- 91, 1987.

CORSOLINI, S.; BORGHESI, N.; ADEMOLLO, N.; FOCARDI, S. Chlorinated biphenyls and pesticides in migrating and resident seabirds from East and West Antarctica. **Environment International**, v.37, n.8, p.1329-1335, 2011.

COSTA, S.; COSTA, C.; MADUREIRA, J.; VALDIGLESIAS, V. *et al.* Occupational exposure to formaldehyde and early biomarkers of cancer risk, immunotoxicity and susceptibility. **Environmental Research**, v.179, p.108740, 2019.

CPA- Clean Product Action. **Assessment for [Aluminum diethylphosphinate (CAS#225789-38-8)]**. 2016. Disponível em: <https://store.greenscreenchemicals.org/gs-assessments/assessment/aluminum diethylphosphinate-cas225789-38-8>. Acesso em: 24 fev. 2020.

DIAMOND, L.; KRUSZEWSKI, F.; ADEN, D. P.; KNOWLES, B. B. *et al.*Metabolic activation of benzo[a]pyrene by a human hepatoma cell line. **Carcinogenesis**, v.1, n.10, p. 871–875, 1980.

DREYER, A.; NEUGEBAUER, F.; LOHMANN, N.; RÜDEL, H. *et al.*Recent findings of halogenated flame retardants (HFR) in the German and Polar environment. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v.253, p.850-863, 2019.

EFRA - The European Flame Retardants Association. Flame Retardants : Frequently Asked Questions. 2007. Disponível em: https://www.flameretardants-online.com/images/itempics/2/9/1/item_18192_pdf_1.pdf. Acessado em: 22 out.2021

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M. *et al.* Methods of in vitro toxicology. **Food Chemical Toxicology**, v.40, n.2, p.193-236, 2002.

EKWALL, B.; SILANO, V.; STAMMATI, A. P.-.; ZUCCO, F. Toxicity tests with mammalian cell cultures. *In*: BOURDEAU, P.;SOMERS, J. R. H., *et al* (Ed.). **Short Term Toxicity Tests For Non- Genotoxic Effects**: John Wiley & Sons Ltd, 1990. cap.7, p.75-91.

ENYILDIZ, M. S.; KILINC, A.; OZDEN, S. Investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of widely used neonicotinoid insecticides in HepG2 and SH-SY5Y cells. **Toxicology and Industrial Health,** v.34, n.6, p. 375- 383, 2018.

ESCH, G. J. VAN, World Health Organization & International Programme for Chemical Safety. (1997). Flame retardants : a general introduction. World Health Organization. Disponível em: < https://inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc192.htm >. Acessado em: 5 out.2021.

ESTILL, C. F.; SLONE, J.; MAYER, A.; CHEN, I.-C. *et al.* Worker exposure to flame retardants in manufacturing, construction and service industries. **Environment International**, v.135, p. 105349, 2020.

FELLOWS, M. D.; O'DONOVAN, M. R.; LORGE, E.; KIRKLAND, D. Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test. I. Theoretical aspects. **Mutation research**, v.655, p.4-21, 2008.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block Micronucleus Cytome Assay. **Nature protocols**, v.2, n.5, p. 1084- 1104, 2007.

FENECH, M.; CROTT, J. W. Micronuclei, Nucleoplasmic Bridges and Nuclear Buds Induced in Folic Acid Deficient Human Lymphocytes-Evidence for Breakage-Fusion-Bridge Cycles in the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay. **Mutation research**, v.504, n.1, p.131-136, 2002.

FÖLLMANN, W.; WOBER, J. Investigation of cytotoxic, genotoxic, mutagenic, and estrogenic effects of the flame retardants tris -(2-chloroethyl)-phosphate (TCEP) and tris -(2-chloropropyl)-phosphate (TCPP) in vitro **Toxicology Letters**, v.161, p.124-134, 2006.

FRANCE, R. L. Elevated PCB contamination of coastal plants near Polynyas in the High Arctic. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.59, n.1, p. 76-82, Jul 1997.

FRESHNEY, R. I. Primary Culture. *In*: **Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications**. 6 ed. New Jersey e Canadá: John Wiley & Sons, 2010. cap.11.

FRESHNEY, R. I. Transformation and Immortalization. *In*: **Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications**. 6 ed. New Jersey e Canadá: John Wiley & Sons, 2010b. cap.17.

GEORGE, A.; DEY, R.; BHURIA, V.; BANERJEE, S. *et al.* Nuclear anomalies, chromosomal aberrations and proliferation rates in cultured lymphocytes of head and neck cancer patients. **Asian pacific journal of cancer prevention**, v.15, n.3, p. 1119-1123, 2014.

GÓMEZ LECHÓN, M. J.; TOLOSA, L.; DONATO, M. T. Cell-based models to predict human hepatotoxicity of drugs. **Revista de toxicología**, v.31, n.2, p.149-156, 2014.

GRIFFITHS, A. J. F.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B.; WESSLER, S. R. **Introdução à Genética**. 11ª ed. Rio de Janeiro: 2016.

GUTZKOW, K. Genotoxicity, mutagenicity and carcinogenicityand REACH. ICAW. Norwegian Institute Public Health 2015.

HALES, B. F.; ROBAIRE, B. Effects of brominated and organophosphate ester flame retardants on male reproduction. **Andrology**, v.8, n.4, p.915-923, 2020.

HAO, C.; HELM, P. A.; MORSE, D.; REINER, E. J. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry direct injection analysis of organophosphorus flame retardants in Ontario surface water and wastewater effluent. **Chemosphere**, v.191, p.288-295, 2018.

HENDRIKS, H. S.; MEIJER, M.; MUILWIJK, M.; VAN DEN BERG, M. *et al.* A comparison of the in vitro cyto- and neurotoxicity of brominated and halogen-free flame retardants: prioritization in search for safe(r) alternatives. **Arch Toxicol**, v.88, n.4, p. 857-869, 2014.

HENDRIKS, H. S.; WESTERINK, R. H. Neurotoxicity and risk assessment of brominated and alternative flame retardants. **Neurotoxicology Teratology**, v.52, p.248-269, 2015

HINDERSINN, R. R. Historical aspects of polymer fire retardance. *In*: NELSON, G. L. (Ed.). **Fire and polymers hazard identification and prevention**. New York, 1990. v.425, cap. 7, p. 87- 89.

HU, W.-P.; LI, X.-M.; CHEN, J.-G.; LI, Z.-W. Potentiation of the nicotinic acetylcholine receptor by aluminum in mammalian neurons. **Neuroscience**, v.147, n.1, p.1-6, 2007.

ISHIYAMA, M.; MIYAZONO, Y.; SASAMOTO, K.; OHKURA, Y. *et al.* A Highly Water-Soluble Disulfonated Tetrazolium Salt as a Chromogenic Indicator for NADH as Well as Cell Viability. **Talanta**, v.44, n.7, p.1299- 1305, 1997.

IHS Markit, 2020. Flame retardants - Specialty Chemicals Update Program (SCUP) apud Flame retardants online. Disponível em: https://www.flameretardants-online.com/. Acessado em: 10 nov. 2021.

JOOA, K.-M.; KIMB, S.; KOOC, Y. J.; LEED, M. *et al.* Development and validation of UPLC method for WST-1 cell viability assay and its application to MCTT HCE™ eye irritation test for colorful substances. **Toxicology in Vitro**, v.60, p.412- 419, 2019.

KATARKAR, A.; MUKHERJEE, S.; KHAN, M. H.; RAY, J. G. *et al.* Comparative evaluation of genotoxicity by micronucleus assay in the buccal mucosa over comet assay in peripheral blood in oral precancer and cancer patients. **Mutagenesis**, v.29, n. 5, p. 325- 334, 2014.

KIM, U. J.; KANNAN, K. Occurrence and Distribution of Organophosphate Flame Retardants/Plasticizers in Surface Waters, Tap Water, and Rainwater: Implications for Human Exposure. **Environ Sci Technol**, v.52, n.10, p. 5625-5633, 2018.

KIRBY, D. P.; VOUROS, P.; KARGER, B. L. Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Secrete the Major Plasma Proteins and Hepatitis B Surface Antigen. **Science**, v.209, p.497-499, 1980.

KOJIMA, H.; TAKEUCHI, S.; ITOH, T.; IIDA, M. *et al.* In vitro endocrine disruption potential of organophosphate flame retardants via human nuclear receptors. **Toxicology**, v.314, n.1, p.76-83, 2013.

LASSEN, C.; WARMING, M.; BRINCH, A.; BURKAL, J. Z. *et al.* Environmental and health screening pro-files of phosphorous flame retardants. The Danish Environmental Protection Agency, 2016. Disponível em: https://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2016/11/978-87-93529-31-1.pdf. Acessado em: 4 nov. 2021.

LEÓN-MEJÍA, G.; LUNA-RODRÍGUEZ, I.; TRINDADE, C.; OLIVEROS-ORTÍZ, L. *et al.* Cytotoxic and genotoxic effects in mechanics occupationally exposed to diesel engine exhaust. **Ecotoxicology and Environmental safety**, v.171, p.264-273, 2019.

LUCAS, D.; PETTY, S. M.; KEEN, O.; LUEDEKA, B. *et al.* Methods of Responsibly Managing End-of-Life Foams and Plastics Containing Flame Retardants: Part I. **Environmental Engineering**, 35, n. 6, p. 573–587, 2018.

MARON, D.; AMES, B. Revised Methods for the *Salmonella* Mutagenicity Test. **Mutation research**, v.113, n.3-4, p.173- 215, 1983.

MILOSEVIĆ-DJORDJEVIĆ, O; GRUJICIĈ, D.; VASKOVIĈ, Z.; MARINKOVIĈ, D. High micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients irrespective of gender, smoking and cancer sites. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v.220, n.2, p.115-120, 2010.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/convencao-de-estocolmo>. Acesso em: 11 jul. 2020.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome Mutagenicity Assay. **Mutation research**, v.455, n.1-2, p.29-60 2000.

NIEHS- National Institute of Environment Health Sciences. Flame Retardants Fact Sheet., 2020. Disponível em:< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Acesso em: 27 agos. 2019.

OECD- The Organisation for Economic Co-operation and Development. Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD Publishing 1997.

OECD- The Organisation for Economic Co-operation and Development. Guideline nº. 474 for Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris: OECD Publishing 2014.

OECD. The Organisation for Economic Co-operation and Development. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris: OECD Publishing 2016.

OGA, S; Camargo, M.M.A; BATISTUZZO, J.A.O. Fundamentos De Toxicologia. 3. Ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 677p.

PEREIRA, L. C.; DE SOUZA, A. O.; MEIRELES, G.; FRANCO-BERNARDES, M. F. *et al.*Comparative Study of Genotoxicity Induced by Six Different PBDEs. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v.119, n.4, p.396-404, 2016.

PIERONI, M. C.; LEONELB, J.; FILLMANNA, G. Retardantes de chama bromados: uma revisão. **Química Nova**, v.40, p.317- 326, 2016.

PINFA- Phosphorus, Inorganic And Nitrogen Flame Retardants Association. Phosphorus based flame retardants. What are Pin FRs. 2016.

RIVA, C.; BINELLI, A.; COGNI, D.; PROVINI, A. Evaluation of DNA damage induced by decabromodiphenyl ether (BDE-209) in hemocytes of Dreissena polymorpha using the comet and micronucleus assays. **Environmental and molecular mutageneis**, v.48, n.9, p.735-743, 2007.

RODAN, B. D. Genesis of the Global Persistent Organic Pollutant Treaty. *In*: RODAN, B. D. (Ed.). **The Foundation for Global Action on Persistent Organic Pollutants: A United States Perspective** Washington: United States Environmental Proctetion Agency, 2002. cap.1.

RUSSELL, W.; BURCH, R. **The Principles of Humane Experimental Technique.** https://www.jhsph.edu/ 1959. Disponível em: https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique. Acesso em: 8 de março de 2021.

SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. **Chemistry Central Journal**, v.8, n.15, 2014.

SETAYESH, T.; KUNDI, M.; NERSESYAN, A.; STOPPER, H. *et al.* Use of micronucleus assays for the prediction and detection of cervical cancer: a meta-analysis. Carcinogenesis. **Carcinogenesi*s***, v.41, n.10, p.1318–1328, 2020.

SHARMA, S.; WAKODE, S.; SHARMA, A.; NAIR, N. *et al.* Effect of environmental toxicants on neuronal functions. **Environmental Science and Pollution Research**, v.27, p.44906-44921, 2020.

SHI, Q.; TSUI, M. M. P.; HU, C.; LAM, J. C. W. *et al.* Acute exposure to triphenyl phosphate (TPhP) disturbs ocular development and muscular organization in zebrafish larvae. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.179, p.119-126, 2019.

SOLDATOW, V. Y.; LECLUYSE, E. L.; GRIFFITH, L. G.; RUSYN, I. *In vitro* models for liver toxicity testing. **Toxicology Research**, v.2, n.1, p.23–39, 2012.

U.S.EPA- United States Environmental Protection agency. **An alternatives assessment for the flame retardant decabromodipheny.** 2014. Disponível em: https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-05/documents/decabde_final.pdf. Acessado em: 4 nov.2021.

UNEP. Stockholm Convention On Persistent Organic Pollutants (POPS). **United Nations Environment Programme (UNEP)**, Switzerland, pp.67-68, 2019.

US.EPA. Furniture flame retardancy partnership environmental profiles of chemical flameretardant alternatives for lowdensity polyurethane foamDensity Polyuretha. AGENCY, U. S. E. P.: DIANE Publishing. 2005.

VALENTIN-SEVERIN, I.; HEGARAT, L. L.; LHUGUENOT, J.-C.; BON, A.-M. L. *et al.* Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagensmscreening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research**, v.536, p.79-90, 2003.

VEEN, I. V. D.; BOER, J. D. Phosphorus flame retardants: Properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis. **Chemosphere**, v.88, p.1119-1153, 2012.

NIU, Y.; LIU, J.; LIANG, Y.; HAO, Z. *et al.* Aluminum Dialkyl Phosphinate Flame Retardants and TheirHydrolysates: Analytical Method and Occurrence in Soil and Sediment Samples from a Manufacturing Site. **Environmental Science & Technology**, v.48, p.3336−3343, 2014.

WAAIJERS, S. L.; BLEYENBERG, T. E.; DITS, A.; SCHOORL, M. *et al.* Daphnid life cycle responses to new generation flame retardants. **Environmental Science and Technology**, v.47, n.23, p.13798-13803, 2013c.

WAAIJERS, S. L.; HARTMANN, J.; SOETER, A. M.; HELMUS, R. *et al.* Toxicity of new generation flame retardants to Daphnia magna. **Science of Total Environment**, v.463, p.1042-1048, 2013b.

WAAIJERS, S. L.; KONG, D.; HENDRIKS, H. S.; DE WIT, C. A. *et al.* Persistence, bioaccumulation, and toxicity of halogen-free flame retardants. *In*: **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. New York: Springer, 2013a. v.222, p.1-71.

ZEIGER, E. Genetic Toxicology Testing. *In*: **Comprehensive Toxicology**. 2 ed., 2010. v.1-14.