

Avaliação da toxicidade de OPFRs em material particulado atmosférico pelo modelo Zebrafish

Palavras-Chave: Poluição atmosférica, *Danio rerio*, compostos orgânicos.

BEATRIZ VITORIA COUTO SANTOS, Faculdade de Tecnologia (FT) – UNICAMP

MANOEL MESSIAS COUTINHO MEIRA, Faculdade de Tecnologia (FT) – UNICAMP

RUAN GABRIEL FERREIRA CARDOSO, Faculdade de Tecnologia (FT) - UNICAMP

Prof^a. DR^a. SIMONE ANDRÉA POZZA, Faculdade de Tecnologia (FT) – UNICAMP

Prof. DR. DIEGO STÉFANI TEODORO MARTINEZ, Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) – CNPEM

INTRODUÇÃO

A poluição do ar é uma preocupação crescente em todo o mundo, resultante principalmente das atividades humanas que liberam uma variedade de contaminantes atmosféricos[1]. Entre esses contaminantes, destacam-se as partículas atmosféricas, como o material particulado (MP), que são misturas suspensas no ar com diferentes tamanhos e composições[2].

O conjunto das Partículas Totais em Suspensão (PTS) e o MP com diâmetro aerodinâmico menor que 10 µg (MP₁₀) possuem um componente crítico em sua composição: os retardantes de chama organofosforados (OPFRs). Essas substâncias apresentam alta resistência à degradação, favorecendo sua persistência no meio ambiente. A presença de OPFRs no PTS e MP₁₀ levanta sérias preocupações sobre os impactos à saúde humana e ambiental[3][4]. Esses compostos podem ser inalados e acumulados no organismo, causando potenciais efeitos adversos. Nesse sentido, a avaliação da toxicidade desses compostos para melhor compreender seus riscos é essencial.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a presença e toxicidade de OPFRs extraídos a partir de amostras de MP coletadas na cidade de Limeira - SP, utilizando embriões de Zebrafish (*Danio rerio*), que possuem processos celulares semelhantes aos humanos, tornando-os modelos ideais para pesquisas toxicológicas e de saúde ambiental[5]. Ao utilizar Zebrafish, espera-se fornecer dados relevantes que contribuam para uma melhor compreensão dos riscos associados aos OPFRs presentes no MP₁₀.

METODOLOGIA

Para a coleta de MP₁₀ e PTS, foram utilizados amostradores de grande volume (AGV) em ciclos de 24 horas, conforme as recomendações das normas brasileiras NBR 13412 [6] e NBR 954 [7]. Cada ciclo de amostragem teve duração de um dia, das 00:00 às 23:59.

Para realizar a extração, foi utilizada 1/8 da área coletada de cada um dos filtros, picada em pequenos pedaços e transferida para um tubo de centrífuga. Em cada amostra, foram acrescentados 10 mL de uma solução de hexano:acetona (Hex:Acet) (1:1). Em seguida, as amostras foram submetidas a vórtex, banho ultrassônico e centrifugação a 3.500 rpm. Cada amostra passou por este ciclo três vezes.

Os extratos foram concentrados em rotaevaporador até sua quase completa evaporação. Para o *clean-up*, foram utilizados cartuchos Florisil (Supelco Supelclean™), e, em seguida, as amostras foram concentradas utilizando fluxo de gás nitrogênio ultrapuro (99,999%). Os extratos foram então

transferidos em volumes iguais para *vials* de 2 mL e evaporados completamente utilizando o fluxo de gás nitrogênio. O extrato foi redissolvido em 400 μL de acetato de etila, e metade do volume foi coletado e armazenado em outro *vial* para análise química. Os 200 μL restantes foram evaporados novamente e redissolvidos em 500 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) para os testes de toxicidade.

As análises químicas foram realizadas utilizando o Cromatógrafo Gasoso Trace GC Ultra da Thermo, acoplado ao espectrômetro de massas ITQ900 da Thermo (CG-MS) com analisador de massas *ion trap*. As amostras foram injetadas utilizando um injetor PTV e um *liner* PTV *Straight Liner*, no modo de injeção *solvent split*, com volume de injeção de 5 μL , conforme Cristale et al. [8]. A injeção foi realizada com o amostrador automático Triplus. A coluna cromatográfica utilizada foi a Zebron ZB5-MS (Phenomenex), com vazão de gás hélio de 1,5 mL/min. O forno da coluna foi programado para uma temperatura inicial de 60°C por 6 minutos, aquecendo em taxas específicas até atingir 230°C por 1 minuto e, em seguida, aquecendo até 280°C a uma taxa de 20°C/min, mantendo essa temperatura por 14 min. As análises foram realizadas nos modos SCAN e SIM. As massas monitoradas, tempo de retenção e rampa de temperatura foram obtidas a partir do estudo de Gonçalves et al. [9].

A toxicidade das frações MP₁₀ e PT5 no desenvolvimento de embriões de peixes foi avaliada de acordo com o guia 236 da OECD (*Fish Embryo Acute Toxicity Test - FET*). Peixes Zebrafish adultos (*Danio rerio*) foram mantidos pelo Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) - CNPEM. Ovos colocados 5 horas pós fertilização (hpf) foram selecionados sob um estereomicroscópio quanto à sua viabilidade. Os ovos foram transferidos individualmente para uma placa de 24 poços com 2 ml de suspensão por poço e mantidos a 28 °C sob 14 h: 10 h, ciclo claro:escuro. A exposição foi realizada utilizando 20 organismos por tratamento sem renovação de meio, sendo: frações MP₁₀ e PTS nos meses de outubro, novembro, dezembro, totalizando 6 grupos, além do grupo controle contendo somente o meio. Também foi realizado um controle positivo, utilizando meio com adição de DMSO na mesma concentração dos tratamentos. As suspensões foram preparadas utilizando água reconstituída (96 mg L⁻¹ NaHCO₃, 60 mg L⁻¹ MgSO₄, 4 mg L⁻¹ KCl, 60 mg L⁻¹ CaSO₄ e pH 7,5 ± 0,5). Após 96 horas de exposição, foram avaliados os seguintes parâmetros: malformação, edema, comprimento total e mortalidade. Os ensaios foram realizados em triplicatas independentes com ovos obtidos de diferentes cruzamentos.

Figura 1: Larva de Zebrafish



Fonte: Autores, 2024.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do ensaio ZFET, foi possível elaborar as Tabelas 1 e 2, que relacionam o número de sobreviventes e ovos eclodidos com o tempo de exposição às amostras de PTS e MP₁₀ coletadas nos meses de outubro, novembro e dezembro. De forma geral, não foram observados mortalidade e formação de edemas nos peixes expostos. Analisando a Tabela 2, é possível observar que todas as amostras de MP₁₀ e a amostra de PTS de outubro tiveram taxa de eclosão em 48 hpf menor quando comparadas com o grupo controle.

Tabela 1: Sobreviventes

Tempo de exposição	Controle	PTS outubro	PTS novembro	PTS dezembro	MP ₁₀ outubro	MP ₁₀ novembro	MP ₁₀ dezembro
24 hpf	20	20	20	20	20	20	20
48 hpf	20	20	20	20	20	20	20
72 hpf	20	20	20	20	20	20	20
96 hpf	20	20	20	20	20	20	20

Fonte: Autores, 2024

Tabela 2: Ovos eclodidos

Tempo de exposição	Controle	PTS outubro	PTS novembro	PTS dezembro	MP ₁₀ outubro	MP ₁₀ novembro	MP ₁₀ dezembro
48 hpf	12	6	12	16	7	7	5
72 hpf	20	20	19	20	20	20	20
96 hpf	20	20	19	20	20	20	20

Fonte: Autores, 2024

Na literatura, Gonçalves et al. [9] analisou a presença e concentração de OPFRs em Limeira e encontrou TPHP e TEHP em todas as amostras, com concentrações médias de $0,55 \text{ ng m}^{-3}$ e $0,10 \text{ ng m}^{-3}$, respectivamente. No presente estudo, foi possível confeccionar a Tabela 3, a partir dos dados obtidos pela GC-MS, contendo os OPFRs detectados nas amostras. Devido à qualidade do ar ser afetada por condições meteorológicas, que influenciam diretamente a química da atmosfera e a dispersão de poluentes [10], o maior número de compostos foi encontrado nas amostras de PTS e MP₁₀ coletadas no mês de novembro, que coincide com um período de ondas de calor que ocorreram na cidade de Limeira. Ao decorrer das coletas do material particulado, foi feito o registro das temperaturas, e, durante as ondas de calor, foi registrado temperatura média de 37°C .

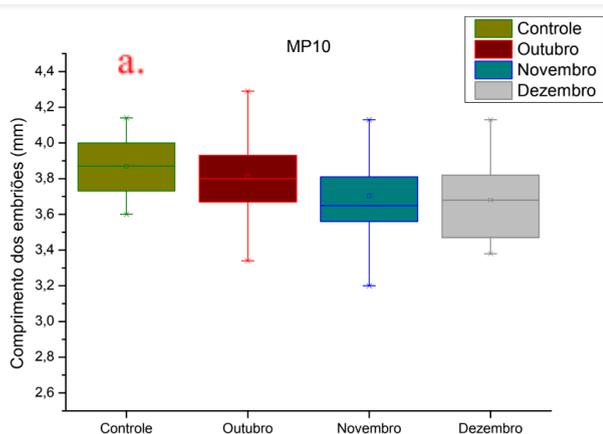
Tabela 3: OPFRs detectados

	TPHP	TDCIPP	TCEP	TNBP	TMPP	TBOEP
MP ₁₀ outubro	-	-	-	-	-	-
MP ₁₀ novembro	X	X	X	X	X	X
MP ₁₀ dezembro	X	-	-	-	X	X
PTS outubro	X	X	-	-	X	-
PTS novembro	X	X	X	X	X	X
PTS dezembro	X	X	-	-	X	-

Fontes: Autores, 2024

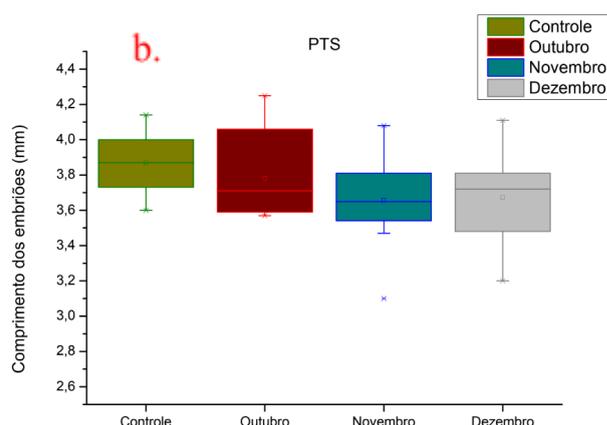
As Figuras 2 (a.) e 3 (b.) contêm os dados relativos ao comprimento das larvas do zebrafish. Foi possível observar que entre as amostras de PTS e MP₁₀ dos meses amostrados, o mês de novembro, que possuiu o maior número de compostos tóxicos, obteve a menor mediana. O teste *T Student* ($p < 0,05$) foi aplicado para atestar a relevância da variação dos comprimentos das larvas expostas em relação ao controle, os resultados do teste com MP₁₀ e PTS referentes ao mês de novembro foram 0,01 e 0,04, respectivamente, com médias 3,65 mm, logo é possível verificar que a variação é significativa.

Figura 2: Comprimento dos embriões em MP₁₀



Fonte: Autores, 2024

Figura 3: Comprimento dos embriões em PTS



Fonte: Autores, 2024

CONCLUSÕES

O ensaio ZFET mostrou os efeitos negativos dos 6 OPFRs detectados na amostra no crescimento das larvas do zebrafish e na sua taxa de eclosão, embora não tenha tido impacto na taxa de sobrevivência. A toxicidade pode ser causada tanto pela ação individual de alguns compostos, quanto pela sua mistura, visto que a interação dos compostos pode acentuar a toxicidade da mistura.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de IC. À equipe da instalação (Nanotox), pela assistência durante os experimentos (SAU 20240212). À Josiane Ap. de Souza Vendemiatti pelo suporte no laboratório da FT. À Dra. Joyce Cristale pelo apoio durante todo o estudo. Esta pesquisa utilizou instalações do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNBio), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), uma Organização Social supervisionada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI).

BIBLIOGRAFIA

- [1] KAMPA, M.; CASTANAS, E. Human health effects of air pollution. **Environmental Pollution**, v. 151, n. 2, p. 362-367, 2008.
- [2] SEINFELD, J. H.; PANDIS, S. N. Atmospheric chemistry and physics: from air
- [3] CHEN, Y. et al. Contamination profiles and potential health risks of organophosphate flame retardants in PM_{2.5} from Guangzhou and Taiyuan, China. **Environment international**, v. 134, p. 105343, 2020.
- [4] CAO, Z. et al. Influence of air pollution on inhalation and dermal exposure of human to organophosphate flame retardants: A case study during a prolonged haze episode. **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 7, p. 3880-3887, 2019.

- [5] DAMMSKI, A. P.; MULLER, B. R.; GAYA, C.; REGONATO, D. Zebrafish: Manual de criação em biotério. 1. ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná (UFPR), 2011. 107 p. Disponível em: <https://gia.org.br/portal/wp-content/uploads/2013/06/ZEBRAFISH.pdf.pdf>. Acesso em: 8 de maio de 2023
- [6] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) - NBR 13412: Material Particulado em Suspensão na Atmosfera – Determinação da concentração de partículas inaláveis pelo método do amostrador de grande volume acoplado a um separador inercial de partículas – método de ensaio, São Paulo, 1995, 8 p.
- [7] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) - NBR 9547: Material Particulado em Suspensão no Ar Ambiente – Determinação da concentração total pelo método do amostrador de grande volume – método de ensaio, São Paulo, 1997, 14 p.
- [8] CRISTALE, J., OLIVEIRA SANTOS, I., FAGNANI, E. Organophosphate esters by GC–MS: An optimized method for aquatic risk assessment. **Journal of Separation Science** 43(4):748–55. 2020
- [9] GONÇALVES, P. B. et al. Organophosphate esters (OPEs) in atmospheric particulate matter in different Brazilian regions. **Environmental Science: Atmospheres**, v. 3, n. 10, p. 1533-1540, 2023.
- [10] FIORE, A. M.; NAIK, V.; LEIBENSPERGER, E. M. Air quality and climate connections. **Journal of the Air and Waste Management Association**, [s.l.], v. 65, no 6, p. 645–685, 2015.