UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Avaliação de variações bioquímicas em
moluscos bivalves em resposta ao estresse
ambiental.

Eduardo Alves de Almeida

Tese de doutorado

SÃO PAULO
2003

“Avaliação de variações bioquímicas em moluscos bivalves em resposta ao estresse ambiental”

EDUARDO ALVES DE ALMEIDA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Prof. Dr. PAULO DI MASCIO
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. PIO COLEPICOLO NETO
IQ – USP

Prof. Dr. MAURÍCIO DA SILVA BAPTISTA
IQ – USP

Profa. Dra. EDUINETTY CECI PEREIRA MOREIRA DE SOUSA
IO – USP

Prof. Dr. LUIS EDUARDO SOARES NETTO
IB – USP

SÃO PAULO
05 DE DEZEMBRO 2003.

Dedico esta tese ao meu irmão Daniel Alves de Almeida, que nasceu no dia 13 de junho de 1980 e veio a falecer no dia 20 de abril de 2003 deixando um grande vazio no meu coração, justo quando faltava tão pouco para a gente voltar a viver mais próximo. Dedico esta tese a você, por todo tempo que a gente ficou distante um do outro.

Agradecimentos

Aos meus queridos pais, pelo incentivo, apoio e amor.

Com amor à minha esposa Beatriz, pela presença constante e pelo incentivo, por acreditar e me compreender, assim como ao meu filho Arthur, que nasceu e cresceu junto com este trabalho.

Ao meu orientador Paolo Di Mascio, pela oportunidade que me deu de aprender tanta coisa nova, e que me aceitou em seu laboratório mesmo não conhecendo nada sobre a fisiologia de moluscos bivalves.

À professora Marisa H.G Medeiros, que junto com o Paolo ajudou-me durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao professor Afonso Celso Dias Bainy, por toda sua ajuda, fundamental no desenvolvimento deste trabalho, e pela amizade constante.

Aos professores Danilo Wilhelm-Filho e Eduinety Ceci de Souza, e aos colegas Moacir e Camilo, pelo fornecimento de algumas das amostras de mexilhões analisadas neste trabalho.

Aos colegas e técnicos do laboratório do Paolo e da Marisa, pela convivência diária e por toda ajuda que me deram, em alguns momentos sendo quase que meus segundos orientadores.

Aos amigos conquistados em São Paulo, em especial ao Nico, Dri, Artur, Gabi, Jorge, Lu, Cíntia, Michelle, Fábio, Rogério e Carlito, pelos momentos de descontração e pelas pizzas e churrascos nos finais de semana.

A todos os meus familiares, por todo apoio recebido durante esses quase 5 anos.

A todos aqueles professores e colegas que ao longo deste trabalho compartilharam seus conhecimentos profissionais, e também, por aqueles que apenas passaram.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de pós-graduação pelo período de 4 anos.

Apoio financeiro

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

PRONEX/FINEP – Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência

Pró-Reitoria de Pesquisa – Universidade de São Paulo

1. Introdução

1.1. A poluição marinha e seu estudo

O caráter predatório da exploração dos recursos naturais e a conseqüente degradação dos diversos ecossistemas nos últimos anos, vêm despertando uma crescente preocupação a nível mundial, especialmente em relação ao constante aumento na produção de resíduos químicos industriais (IBGE, 1997).

Dentre os diversos tipos de contaminantes destacam-se os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilas policloradas (PCBs), dioxinas, compostos nitroaromáticos, metais pesados e diversos tipos de pesticidas, por serem compostos potencialmente citotóxicos e/ou carcinogênicos aos diversos organismos vivos, e que são produzidos em grande escala. Por sua vez, estes contaminantes podem se introduzir no ambiente marinho via atmosfera, despejo direto de efluentes de esgotos ou através dos rios (LEMAIRE & LIVINGSTONE, 1993).

De uma forma geral, a poluição marinha pode ser definida como a presença de compostos orgânicos ou inorgânicos no ambiente marinho (seja na água, no sedimento ou nos próprios organismos residentes), geralmente de origem antrópica, que provocam alterações nas características do ecossistema (VIARENGO & CANESI, 1991).

Os poluentes lançados no ecossistema podem provocar uma série de distúrbios metabólicos nos organismos, tais como infertilidade, baixa nas defesas imunológicas, diminuição do crescimento e patologias que podem levar à morte dos indivíduos (STEGEMAN *et al.*, 1992).

Nesse contexto, estudos relacionados à contaminação marinha assumem grande importância, devido às diversas funções do ambiente marinho na dinâmica e manutenção do equilíbrio do planeta e pela elevada agressão a que vêm sendo submetido (IBGE, 1997). Este impacto, geralmente caracterizado por descargas periódicas de efluentes de origem doméstica,

industrial, hospitalar, entre outros, pode comprometer o equilíbrio do ecossistema marinho, por vezes de uma forma pouco evidente, porém bastante tóxica.

De acordo com um levantamento feito pelo censo de 1991, dos 146 milhões de habitantes do Brasil na época, cerca de 32,5 milhões viviam em municípios litorâneos, sendo que 22% da população brasileira habita à beira mar (MCD/MMA, 1996). Essa população se distribui ao longo da costa, perfazendo uma densidade demográfica de 87 hab./km², cinco vezes superior à média nacional, que apresenta um valor de 17 hab/km². Na verdade, metade da população brasileira reside a não mais de 200 km do mar, o que equivale a um efetivo de mais de 70 milhões de habitantes, cuja forma de vida causa impacto direto aos ambientes litorâneos (MCD/MMA, 1996).

Segundo o item 17.21 da Agenda21¹, para impedir a degradação do meio ambiente marinho é preciso adotar uma abordagem de precaução e antecipação mais que de reação. Para tanto é necessário adotar medidas de precaução através da avaliação dos impactos ambientais de forma a estabelecer critérios qualitativos de gerenciamento para o manejo adequado sobre os lançamentos de efluentes industriais e domésticos no ambiente. Seja qual for a estrutura de gerenciamento adotada, ela deverá incluir a melhoria dos estabelecimentos humanos costeiros e o desenvolvimento integrado das zonas costeiras.

O aumento do aporte antropogênico na zona costeira brasileira, causado principalmente pela crescente concentração populacional nestas regiões, aliado ao deficiente sistema de tratamento de efluentes, tem provocado um constante impacto *sub-crônico* ao ecossistema marinho brasileiro. Para tentar reverter tal situação, faz-se necessária a implantação de

¹ A Agenda 21, é um documento consensual para o qual contribuíram governos e instituições da sociedade civil de 179 países num processo preparatório que culminou com a realização da Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (CNUMAD), em 1992, no Rio de Janeiro. A Agenda 21 traduz em ações o conceito de desenvolvimento sustentável. O capítulo 17 da Agenda 21 trata da conservação do ambiente marinho.

projetos de diagnóstico e recuperação dos diversos ecossistemas litorâneos bem como de tratamento de efluentes.

Diferentes estratégias podem ser adotadas para se estudar o nível de poluição do ambiente marinho. Uma delas pode ser a análise e identificação dos poluentes (metais, hidrocarbonetos, pesticidas, etc.) presentes na água, no sedimento e nos organismos. Entretanto, apesar de serem técnicas muito mais precisas, apresentam um custo operacional muito alto, além de não indicarem os efeitos tóxicos nos organismos. Uma outra maneira, é através da análise de indicadores bioquímicos de estresse, ou *biomarcadores*.

1.2. Biomarcadores de poluição marinha

Walker *et al.* (1996) definem biomarcadores ou bioindicadores de poluição, como alterações biológicas a nível molecular, celular ou fisiológico avaliadas em organismos, que expressam a exposição e os efeitos tóxicos causados pelos poluentes presentes no ambiente. Neste contexto, um grande esforço tem sido feito por parte de pesquisadores com o intuito de se diagnosticar respostas típicas de diferentes sistemas bioquímicos frente a exposição de organismos marinhos a diferentes classes de contaminantes, de modo que hoje é grande o número de trabalhos propondo novos sistemas como bioindicadores da poluição marinha.

Classicamente, os biomarcadores são classificados em 3 categorias: Biomarcadores de exposição, biomarcadores de susceptibilidade e biomarcadores de efeito (WHO, 1993).

Biomarcadores de exposição estão relacionados com a detecção ou medida de uma substância exógena ou o produto da interação de um xenobiótico com células ou moléculas alvo de um organismo, o qual indica a que classe de poluentes este organismo poderia estar exposto.

Os biomarcadores de susceptibilidade estão relacionados com a habilidade inerente de um organismo de responder à exposição a diferentes xenobióticos, incluindo fatores genéticos e mudanças em receptores celulares os quais alteram a susceptibilidade do organismo frente aos xenobióticos.

Biomarcadores de efeito incluem medidas de alterações bioquímicas e/ou fisiológicas nos tecidos ou fluidos de um determinado organismo, as quais possam ser reconhecidas como decorrentes de alterações ambientais ou doenças. Estes tipos de biomarcadores são geralmente os mais estudados, e incluem os sistemas estudados neste trabalho.

Um dos principais fatores que torna o estudo de biomarcadores bioquímicos importante em organismos marinhos é porque podem fornecer dados sobre os efeitos biológicos de diferentes poluentes presentes no ambiente marinho. Analisando-se múltiplos biomarcadores, pode-se também obter importantes informações a respeito da exposição dos organismos aos contaminantes. Geralmente, um estresse ocasionado por poluentes ativa uma cascata de respostas biológicas, as quais em teoria podem ser consideradas cada uma como um biomarcador (van der OOST *et al.*, 2003).

Dentre os sistemas biológicos mais estudados e recomendados como biomarcadores em programas de biomonitoramento ambiental marinho, destacam-se os sistemas que levam a um desbalanço entre a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs/ERNs) e sua desativação por sistemas antioxidantes, levando a uma situação denominada de estresse oxidativo (BURGEOT *et al.*, 1996; Sies *et al.*, 1993). Isto se deve ao fato de que a biotransformação de xenobióticos é tipicamente acompanhada de um grande aumento na produção de EROs/ERNs.

1.3. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs/ERNs)

A maior parte do oxigênio molecular (O_2) consumido pelos organismos aeróbios, é reduzida intramitocondrialmente a água (H_2O), via transferência de 4 elétrons ao O_2 , sem a liberação de intermediários reativos:

Entretanto uma pequena fração deste O_2 pode ser reduzida em passos monoeletrônicos gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot OH$), de acordo com o esquema 1.1. (DAVIES, 1995).

Esquema 1.1. – Redução monoeletrônica do oxigênio molecular gerando espécies reativas de oxigênio.

In vivo, muito dos radicais $\cdot OH$ produzidos, são também gerados através da redução do H_2O_2 pelo $O_2^{\cdot-}$ (reação de Haber-Weiss), um processo em duas etapas catalisado por metais de

transição, principalmente ferro e cobre, e envolve reações de Fenton (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; KEHRER, 2000):

Uma outra ERO de importância biológica é o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), a forma eletronicamente excitada do oxigênio molecular, a qual pode ser gerada via mecanismos de fotossensibilização. Reações de fotossensibilização podem gerar $^1\text{O}_2$ pela transferência da energia de um fotossensibilizador no estado excitado para moléculas de O_2 adjacentes (fotossensibilização do tipo II) ou gerar outras espécies radicalares por uma direta interação do fotossensibilizador no estado excitado com moléculas adjacentes (fotossensibilização do tipo I) (FOOTE, 1991; MARTIN & LOGSDON, 1987).

O $^1\text{O}_2$, possui grande importância em sistemas biológicos e patológicos. Fotossensibilizadores como a porfirina, clorofila e riboflavina, podem transferir energia para o oxigênio molecular, gerando $^1\text{O}_2$. Em sistemas biológicos podem ser gerados como resposta imunológica por macrófagos e neutrófilos, metabolismo do ácido araquidônico, peroxidação lipídica e por uma série de reações enzimáticas (EPE, 1991; DI MASCIO *et al.*, 1995).

Espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são também produzidas em grandes quantidades nos organismos. De especial atenção, está a produção de óxido nítrico (NO) pela enzima óxido nítrico sintase. O NO possui diversas funções biológicas importantes nos organismos. O NO pode, por exemplo, ligar-se ao Fe^{3+} do grupamento heme da enzima guanilato ciclase, resultando num aumento na síntese de GMP cíclico, o qual está relacionado

a um decréscimo nos níveis de Ca^{2+} no citosol, causando relaxamento muscular, dilatando as vasos sanguíneos e assim abaixando a pressão do sangue. Por outro lado, o NO é o precursor de uma série de produtos referidos como ERNs (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Em solução aquosa, o NO reage rapidamente com o oxigênio dissolvido, dando origem a nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). Além disso, o radical NO pode também reagir com o radical O_2^- formando peroxinitrito (ONOO^-).

1.4. Biotransformação de xenobióticos e produção EROs/ERNs

O metabolismo de diversos xenobióticos tem sido estudado extensivamente em organismos marinhos. A presença de enzimas de biotransformação, em especial o sistema de monooxigenases de função mista (MOFM), o qual inclui o citocromo P450, citocromo *b5* e NADPH citocromo P450 redutase, tem sido encontrados em diversos tecidos de organismos marinhos, porém geralmente em maiores concentrações no fígado de vertebrados ou em tecidos similares em invertebrados, tais como as glândulas digestivas de moluscos bivalves (LIVINGSTONE, 2001).

Os xenobióticos sofrem biotransformação a diferentes produtos em duas fases do metabolismo. Na fase I, grupos funcionais tais como -OH, -NH₂, -COOH, etc., são introduzidos nos compostos xenobióticos através da ação de oxidases, redutases, hidrolases, etc., os quais na fase II são então conjugados com moléculas endógenas pela ação de enzimas conjugases. Estes produtos conjugados são geralmente menos tóxicos e mais hidrossolúveis, portanto mais fáceis de serem excretados (BAINY, 1996).

Porém, apesar da biotransformação resultar na detoxificação de muitos xenobióticos a metabólitos facilmente excretáveis, muitas vezes pode resultar também na ativação de espécies

químicas mais reativas. De maior importância estão a produção de metabólitos radicalares ou eletrofílicos, e aumento na geração EROs/ERNs (SOLÉ *et al.*, 1995).

1.4.1. O ciclo catalítico do sistema multienzimático das monooxigenases de função mista (MOFM)

O citocromo P450 compreende uma grande família de heme proteínas ligadas a membranas, as quais encontram-se predominantemente no retículo endoplasmático das células (STEGEMAN *et al.*, 1992; BUCHELI & FENT, 1995).

As reações do citocromo P450 podem ser organizadas de acordo com o tipo de substrato e podem ser divididas entre a biossíntese e degradação de compostos endógenos e a metabolização de xenobióticos (STEGEMAN *et al.*, 1992). A bioquímica e biologia celular das monooxigenases dependentes de citocromo P450, incluindo perspectivas sobre suas formas, funções e regulação em organismos aquáticos tem sido extensivamente estudada (STEGEMAN & HABN, 1994).

O mais importante aspecto do sistema MOFM é sua habilidade de facilitar a excreção de compostos lipofílicos, por torná-los mais hidrossolúveis (BUCHELI & FENT, 1995). A figura 1.1. representa esquematicamente o ciclo catalítico deste sistema. Numa primeira etapa, o substrato liga-se ao ferro oxidado (Fe^{3+}) do grupo prostético heme do citocromo P450. Em seguida, o Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} via a transferência de um elétron do NADPH pela flavoproteína NADPH citocromo P450 redutase. Na sequência, o O_2 é ligado ao complexo citocromo P450/substrato, sendo este um ponto crítico onde a catálise do substrato pode prosseguir ou ser interrompida, o que resultaria na autooxidação do oxigênio liberando O_2^- . Para evitar esse processo, a ligação do O_2 ao sistema deve ser acoplada a uma rápida transferência de um segundo elétron do NADH ao sistema pelo citocromo b5 (via citocromo

b5 redutase), formando um peróxido no sistema (reação reversível, na qual pode haver a liberação de H_2O_2), seguido da quebra da ligação entre os átomos de oxigênio, a formação de um radical no substrato e a hidroxilação deste radical, liberando o produto hidroxilado (van der OOST *et al.*, 2003).

Assim, em ambientes altamente contaminados, pode haver uma deficiência no controle dos passos do ciclo catalítico do citocromo P450 favorecendo uma produção aumentada de EROs/ERNs, em função de uma atividade exacerbada deste sistema na detoxificação dos xenobióticos. O suprimento de elétrons para o sistema pode por exemplo não acompanhar o nível de atividade do sistema, o que favoreceria a produção de $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 , podendo como consequência levar o organismo a uma situação de estresse oxidativo.

Sob tal situação, modificações metabólicas em diferentes níveis podem ocorrer nos organismos. Tais modificações, muitas vezes típicas, tem sido acessadas por pesquisadores em programas de biomonitoramento ambiental como indicativas de uma possível contaminação ambiental por xenobióticos. Dentre estas modificações, destacam-se análises de lesões em biomoléculas e alterações na atividade de sistemas antioxidantes (LIVINGSTONE, 2001).

Figura 1.1. – Esquema geral do ciclo catalítico do citocromo P450, com a indicação dos passos onde $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 podem ser gerados, de acordo com explicação no texto. SH representa o substrato e SOH o substrato hidroxilado, ao final do ciclo.

1.5. Lesões em biomoléculas

1.5.1. Lesões oxidativas ao DNA

O DNA é uma molécula altamente estável mas que pode sofrer certas decomposições químicas espontâneas ao longo do tempo. Perdas de purinas por exemplo, ocorrem normalmente numa taxa de 10^4 vezes ao dia no genoma humano. Assim, uma situação de estresse oxidativo pode aumentar os níveis de danos ao DNA. Dentre os principais tipos de lesões oxidativas ao DNA, estão incluídos quebras nas fitas, danos a 2-desoxiriboses e modificações das bases nitrogenadas (WISEMAN & HALLIWELL, 1996).

Uma das mais utilizadas técnicas para se avaliar lesões oxidativas ao DNA, são dosagens de bases modificadas, sendo a mais comum delas a dosagem de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodGuo, figura 1.2.) (KASAI, 1997).

Figura 1.2. - Oxidação da 2'-desóxiguanosina pelos radicais $\cdot\text{OH}$ e $^1\text{O}_2$, formando a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina.

Espécies reativas como o $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou NO em pH fisiológico, aparentemente não reagem com nenhuma das bases do DNA. Entretanto, como é de se esperar pela alta reatividade do radical $\cdot\text{OH}$, exposições de DNA à esta espécie reativa podem gerar diversos produtos, uma vez que este radical ataca açúcares, purinas e pirimidinas, em diversas posições. O radical $\cdot\text{OH}$ pode, por exemplo, reagir com uma 2-desoxiguanosina nas posições 4, 5 ou 8 do anel purínico. A adição do $\cdot\text{OH}$ na posição 8 produz 8-oxodGuo (BREEN & MURPHY, 1995)

Além disso, estudos *in vitro* também têm demonstrado a ação do $^1\text{O}_2$ sobre certas bases nitrogenadas do DNA, e mostram que essa espécie possui reatividade preferencial por resíduos de guanosina, havendo formação principalmente 8-oxodGuo (RAVANAT & CADET, 1995; MARTINEZ *et al.*, 2002). Muitos destes estudos foram feitos *via* fotossensibilização das bases do DNA com corantes como por exemplo o azul de metileno. Neste processo de fotossensibilização, o azul de metileno absorve luz produzindo azul de metileno no estado

excitado singlete, que então pode converter-se ao estado triplete por *intersystem crossing*. O azul de metileno no estado triplete pode então transferir sua energia ao oxigênio molecular no estado fundamental triplete gerando $^1\text{O}_2$. Schneider *et al.* (1990), demonstraram que em DNA fotossensibilizado com azul de metileno na presença de oxigênio, a formação de bases oxidadas é mais freqüente que quebras de simples fita do DNA, confirmando a alta especificidade do $^1\text{O}_2$ por resíduos de guanina.

Alguns estudos de biomonitoramento do ambiente marinho tem recomendado a análise de níveis de 8-oxodGuo em organismos marinhos como biomarcadores da qualidade ambiental marinha. Entretanto, ainda são poucos os trabalhos que utilizam análises desta lesão como bioindicadora de poluição, nos quais foram observados correlações positivas entre os níveis de 8-oxodGuo e o grau de contaminação do ambiente (LIVINGSTONE, 2001).

1.5.2. Peroxidação de lipídeos

Ácidos graxos poli-insaturados são particularmente susceptíveis ao ataques por EROs/ERNs. A abstração de um átomo de hidrogênio destes ácidos graxos por um radical, pode levar a formação de um radical lipídico que por sua vez pode reagir com o O_2 , formando um radical peroxil (figura 1.3.). Este por sua vez pode abstrair um átomo de hidrogênio de um outro ácido graxo adjacente estabelecendo assim uma cadeia de reações autocatalíticas que leva à oxidação das membranas em hidroperóxidos lipídicos (ESTERBAUER, 1984).

A peroxidação lipídica tem sido indicada como uma das maiores contribuidoras para a perda da função celular sob situações de estresse oxidativo. A peroxidação lipídica pode por exemplo provocar o rompimento das membranas celulares levando a uma liberação de cálcio para as células e, por consequência, levar a uma ativação descontrolada de lipases e proteases,

enquanto que o ataque a membranas mitocondriais pode alterar sua permeabilidade e induzir a um desequilíbrio da energética celular (STOREY, 1996).

Figura 1.3. – Esquema geral da cadeia de reações da peroxidação de lipídeos levando à formação de aldeídos tais como o malondialdeído. $\text{X}^\bullet$ = radical.

Mas além do dano causado às membranas, os hidroperóxidos derivados da peroxidação lipídica podem eventualmente ser metabolizados enzimaticamente produzindo uma série de produtos de menor peso molecular tais como alcanos, alcenos, derivados epóxidos, cetonas ou polihidroperóxidos. A decomposição de hidroperóxidos lipídicos é importante porque gera produtos mais estáveis que os radicais livres que iniciaram o processo e os radicais formados durante a fase de propagação da lipoperoxidação (VACA *et al.*, 1988).

Uma série de métodos têm sido descrita na literatura para dosagens de porcentagem de peroxidação lipídica, tais como o ensaio iodométrico e reações catalisadas por peroxidases que conseguem quantificar diretamente certos produtos como hidroperóxidos. Outros quantificam o dano causado pela peroxidação incluindo a formação de dienos conjugados de vários produtos de decomposição como malonodialdeído, lipofucsina, alcenos, entre outros) (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1990). Ao contrário das dosagens de 8-oxodGuo, análises de peroxidação lipídica tem sido extensivamente utilizadas em organismos marinhos, como indicadoras da qualidade ambiental.

1.5.3. Etenoadutos de DNA

A maioria dos estudos de adutos de DNA reportados na literatura relacionados com a contaminação ambiental por xenobióticos, tratam de análises de adutos formados entre o DNA e o próprio xenobiótico ou então com produtos da biotransformação dos xenobióticos. Dentre eles podemos destacar adutos formados a partir de produtos ativados na metabolização de benzo[a]pireno, acetilaminofluoreno e 4-nitroquinolina,1-óxido pelo citocromo P450 (LIVINGSTONE, 1993; HARVEY & PARRY, 1998; CANOVA *et al.*, 1998)

Por outro lado, adutos formados entre o DNA e compostos endógenos tem sido recentemente reportados na literatura, em especial adutos de DNA formados a partir de

produtos secundários da peroxidação lipídica em situações de estresse oxidativo (FUJIMOTO *et al.*, 1984; NAIR *et al.*, 1999).

Os sistemas biológicos contêm uma grande infinidade de ácidos graxos e consequentemente uma situação de peroxidação lipídica produzirá uma grande variedade de diferentes aldeídos e espécies radicalares (CHEESEMAN, 1993). Dados na literatura tem demonstrado que alguns desses aldeídos podem reagir diretamente com o DNA ou serem metabolizados a epóxidos, que são compostos altamente reativos com o DNA e conseqüentemente altamente mutagênicos. Dentre os produtos finais da peroxidação lipídica mais estudados quanto à sua reatividade com o DNA estão os aldeídos, principalmente o malonodialdeído (MDA) e o *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE) (SEGERBÄCK, 1983).

O HNE reage com uma grande quantidade de biomoléculas, apresentando muitos efeitos citotóxicos como inibição de enzimas, inibição da síntese de proteínas, DNA e RNA, indução de proteínas de choque térmico, entre outros (ESTERBAUER *et al.*, 1985). Já foi detectada a formação de adutos cíclicos entre HNE e 2'-desoxiguanosina *in vitro*. Tais adutos podem ser formados tanto pela reação direta de HNE com 2'-desoxiguanosina, originando o aduto cíclico 1,N²-propano-2'-desoxiguanosina (WINTER *et al.*, 1986, figura 4) como pela formação do seu epóxido (2,3-epoxi-4-hidroxinonenal). Este por sua vez reage com 2'-desoxiguanosina originando o aduto cíclico 1,N²-eteno-2'-desoxiguanosina (1,N²-εdGuo, figura 1.4.) (SODUM & CHUNG, 1988; LOUREIRO *et al.*, 2000; LOUREIRO *et al.*, 2002).

Apesar de já ter sido caracterizada a presença de etenodutos tais como o 1,N²-εdGuo em mamíferos, não existem relatos na literatura sobre sua detecção em organismos marinhos.

Figura 1.4. - Mecanismos propostos para a formação de 1, N^2 -propanodG (A) e 1, N^2 -edGuo (B).

1.6. Sistemas de defesa antioxidantes

1.6.1. Superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase

Para proteger as células contra os danos causados pelas EROs/ERNs, os organismos possuem eficientes sistemas de defesas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos celulares, que podem prevenir sua formação, inativar as reações oxidativas ou reparar o dano causado (SIES, 1993). Dentre os sistemas enzimáticos mais importantes estão as enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) (HEBBEL, 1986; SIES, 1993).

As SODs são um grupo de metaloenzimas que catalizam a conversão de $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (McCORD & FRIDOVICH, 1969).

Por sua vez, o H_2O_2 pode ser detoxificado pela CAT e pela GPx a O_2 e H_2O , sendo que a GPx utiliza a glutathione reduzida (GSH) como doadora de elétrons para a redução do H_2O_2 além de outros peróxidos orgânicos (KEELING & SMITH, 1982; FARBER *et al.*, 1990).

Enzimas de defesa antioxidante tem sido amplamente utilizadas para expressar o grau de contaminação de determinados ambientes. Dependendo do tipo de contaminante e do tempo de exposição dos organismos aos locais contaminados, aumentos (TORRES *et al.*, 2002) ou decréscimos (RODRÍGUEZ-ARIZA *et al.*, 1993) na atividade destas enzimas tem

sido observados. Os aumentos na atividades de enzimas antioxidantes podem ser derivados de um acréscimo na produção de EROs/ERNs, resultando numa indução exacerbada destes sistemas de forma a combater os efeitos deletérios das espécies reativas. Já uma diminuição da atividade das enzimas antioxidantes tem sido correlacionados com sua inibição por determinados compostos ou em função de uma prolongada exposição do organismo a ambientes altamente contaminados, numa situação onde a produção de espécies reativas e seu decorrente nível de injúrias ao metabolismo sobrepôs-se aos esforços de defesa do organismo.

1.6.2. Glutathione S-transferase

Os compostos derivados dos xenobióticos produzidos durante a fase I da biotransformação devem ser ligados a moléculas endógenas através de reações de conjugação (fase II). Este mecanismo bioquímico de defesa serve para aumentar a hidrossolubilidade dos compostos e, dessa maneira, facilitar a sua excreção. Uma das enzimas importantes neste processo é a glutathione S-transferase (GST), a qual catalisa reações de conjugação entre uma grande variedade de xenobióticos com a GSH (TAN *et al.*, 1987).

Por este motivo, esta é uma enzima também bastante analisada em organismos coletados em ambientes com suspeita de contaminação, uma vez que sua atividade aumentada pode indicar uma grande produção de compostos derivados da fase I da biotransformação dos xenobióticos, os quais devem ser conjugados com a GSH para serem excretados posteriormente.

1.6.3. Glutathione peroxidase específica para hidroperóxidos de lipídeos (PHGPx)

Apesar de a enzima GPx reduzir H_2O_2 e outros hidroperóxidos orgânicos, esta enzima não possui a capacidade de reduzir hidroperóxidos formados em fosfolipídeos de membrana

sem antes haver a liberação do ácido graxo contendo o hidroperóxido pela ação da fosfolipase A2, o qual pode então ser reduzido ao álcool correspondente pela GPx (SEVANI *et al.*, 1983; van KUIJK *et al.*, 1986, figura 1.5.). Entretanto, nas células de mamíferos foi descrita uma enzima GPx que possui alta reatividade com hidroperóxidos de fosfolípidos (PHGPx) (URSINI *et al.*, 1985; YAGI *et al.*, 1996). Da mesma forma que a GPx, a PHGPx também utiliza os elétrons da GSH para reduzir os hidroperóxidos dos fosfolípidos aos respectivos álcoois de fosfolípidos. Mas apesar de esta enzima ter sido encontrada em tecidos de mamíferos, não existem relatos da sua detecção em tecidos de organismos marinhos.

Figura 1.5. – Mecanismo de ação da glutathiona peroxidase específica para hidroperóxidos de lipídeos (PHGPx) e da fosfolipase A2 (PLA2). A PHGPx utiliza elétrons da glutathiona reduzida (GSH) para reduzir os hidroperóxidos aos seus álcoois correspondentes. A PLA2 cliva o fosfolípido liberando o ácido graxo contendo o hidroperóxido (AGOOH), o qual pode ser reduzido ao álcool correspondente pela glutathiona peroxidase.

1.7. Inibição da acetilcolinesterase

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela hidrólise da acetilcolina à colina e ácido acético nas sinapses (figura 1.6.). Classicamente sabe-se que poluentes como organofosforados e inseticidas do tipo carbamatos inibem atividade desta enzima, ligando-se ao sítio catalítico da mesma (NAJIMI *et al.*, 1997; TIMBREL, 1998; CAJARAVILLE *et al.*, 2000). Assim, esta enzima tem sido utilizada como indicadora da exposição de organismos a estes tipos de compostos, nos tecidos de vertebrados e invertebrados (NARBONE *et al.*, 1999; TORRE *et al.*, 2000). Em organismos aquáticos, especialmente em moluscos bivalves, existem poucos estudos examinando efeitos de poluentes na atividade da AChE. Alguns trabalhos tem sido realizados com esta enzima em mexilhões da região de Ebro Delta (Catalunia, Espanha), uma área onde diversos pesticidas, incluindo carbamatos, são muito usados, e onde a atividade de maricultura é muito grande, fazendo-se necessário este tipo de estudo (CAJARAVILLE *et al.*, 2000). Basicamente, mede-se a porcentagem de inibição da AChE em relação a grupos controle e infere-se sobre a presença de compostos do tipo organofosforados e carbamatos no ambiente.

Figura 1.6. – Esquema mostrando a reação de degradação do neurotransmissor acetilcolina em acetil e colina, pela acetilcolinesterase (AChE).

1.8. O uso de moluscos bivalves como organismos sentinela

Dentre os organismos sentinela mais utilizados em programas de biomonitoramento do ambiente marinho utilizando biomarcadores bioquímicos, destacam-se os moluscos bivalves, por apresentarem uma série de características especiais que facilitam seu manuseio (KRISHNAKUMAR *et al.*, 1997).

Segundo o relatório final da primeira fase da implementação do *International Mussel Watch Project* (NOAA TECHNICAL MEMORANDUM, 1995), os principais atributos dos mexilhões, no sentido de sua utilização como organismo-sentinela são:

- Existe uma forte correlação entre a concentração de poluentes dentro do organismo e sua concentração no ambiente;

- São organismos cosmopolitas, o que minimiza o problema que poderia surgir, caso tivéssemos que comparar dados de diferentes áreas, e as espécies estudadas fossem diferentes, o que diminuiria a confiabilidade dos resultados;
- São muito resistentes a vários tipos de poluentes e podem existir em habitats altamente contaminados;
- São animais sedentários, o que resulta em uma expressão mais representativa do local de amostragem do que outros animais que se locomovem;
- São geralmente abundantes em populações relativamente estáveis e podem, assim, serem amostrados repetidamente em diferentes períodos;
- Possuem um tempo de vida relativamente longo, o que possibilita serem monitorados ao longo de um ano ou mais, se desejado;
- Possuem uma boa morfologia, fornecendo uma quantidade de tecidos adequada para as análises;
- São de fácil coleta e podem facilmente sobreviver em laboratório;
- Possuem alta tolerância a diferentes fatores ambientais como salinidade, disponibilidade de oxigênio e pH, podendo desta maneira serem facilmente transplantados para outras áreas;
- Possuem valor comercial e portanto, a medida da contaminação dos locais de coleta dos mexilhões tornam-se de interesse da saúde pública.

Considerando estas vantagens, vários trabalhos de monitoramento marinho têm sido realizados, utilizando mexilhões como organismo-sentinela. Dentre eles, destaca-se o *Mussel Watch Project*. Este programa realizou um extenso monitoramento das águas da América do Norte, na década de 70, numa tentativa de estabelecer critérios qualitativos para a contaminação do ambiente marinho. Um resultado interessante apresentado por este programa

foi que, do ponto de vista das análises químicas, que foi o parâmetro analisado, os mexilhões expressaram melhor o nível de contaminação ambiental do que peixes, que eram preferencialmente utilizados anteriormente (BAYNE, 1989).

1.9. Fatores ambientais como fonte de artefato no estudo de biomarcadores

Como descrito até aqui, inúmeras são as vantagens do uso de certos sistemas bioquímicos como biondicadores de contaminação ambiental. Entretanto, estes sistemas apresentam também suas desvantagens, pois em alguns casos pode-se não saber até que ponto determinadas variações observadas no metabolismo foram causadas em decorrência da exposição dos organismos aos poluentes ou causadas por variações no ambiente marinho não relacionadas à poluição, tais como mudanças de temperatura ou salinidade da água, disponibilidade de oxigênio e alimento, ritmos biológicos circadianos e sazonais, etc (STOREY, 1996).

Desta forma, faz-se necessário o estudo das respostas bioquímicas destes organismos frente a tais oscilações ambientais, de forma a se estabelecerem critérios qualitativos para a implementação de experimentos e interpretação de resultados obtidos em estudos de biomonitoramento ambiental.

1.9.1. Oscilações dos níveis de maré

Diversos estudos indicam que os periódicos ciclos de exposição de moluscos bivalves ao ar seguido de re-submersão na água do mar em virtude das oscilações nos níveis de maré, podem ser responsáveis por grandes variações na fisiologia destes animais (STEFFANI & BRANCHI, 2003). Quando mexilhões de um costão rochoso são expostos ao ar, o fluxo de oxigênio das brânquias para os tecidos cai bruscamente devido a um decréscimo contínuo na

concentração do O₂ dissolvido na água contida no interior das valvas, o qual é rapidamente consumido (LARADE & STOREY, 2002).

Porém, diversas estratégias podem ser adotadas por estes organismos em resposta à esta condição. Alguns estudos indicam que muitas espécies de moluscos bivalves diminuem em até 80 % o batimento cardíaco quando expostos ao ar nas marés baixas, entrando em uma condição de *semi-estivação*, de forma a minimizar os gastos energéticos (JAMES *et al.*, 1996).

Após re-oxigenação (quando a maré sobe), poderia ocorrer uma grande produção de EROs/ERNs em virtude de um fluxo aumentado de O₂ para os tecidos e da oxidação de produtos ácidos acumulados durante o período de hipóxia (JONES, 1986; HERMES-LIMA & STOREY, 1995).

Algumas estratégias bioquímicas foram também desenvolvidas ao longo da evolução dos mexilhões de forma a minimizar os efeitos deletérios decorrentes dos ciclos de maré. De especial atenção, destaca-se um eficiente e intrincado metabolismo fermentativo, o qual envolve a condensação de alguns aminoácidos com piruvato formando compostos denominados “opinas”, os quais garantem o fluxo de NAD⁺ para a via glicolítica (SANDEE *et al.*, 1996).

Além disso, alguns estudos em mamíferos evidenciam que durante uma situação de hipóxia o ATP pode ser degradado a AMP e posteriormente à hipoxantina e xantina, e a enzima xantina desidrogenase se converte a xantina oxidase, em vias alternativas de produção de energia (JONES, 1986). Após re-oxigenação, a xantina oxidase pode oxidar a xantina à ácido úrico produzindo uma grande quantidade de O₂⁻. Em mexilhões, já foi verificado que não existe atividade de xantina oxidase, o que foi atribuído a uma resposta adaptativa destes animais aos constantes ciclos de

exposição ao ar e re-submersão, de forma a minimizar a produção de EROs (CANCIO & CAJARAVILLE, 1999).

Estes dados comprovam que os ciclos de exposição ao ar e re-submersão dos mexilhões na água do mar em função dos níveis de maré pode ocasionar mudanças bruscas no metabolismo destes animais as quais poderiam mascarar os efeitos de uma possível contaminação ambiental por xenobióticos.

1.9.2. Variações de salinidade

Um outro fator que poderia causar artefato no uso de certos sistemas como biomarcadores de poluição em bivalves são variações de salinidade, especialmente em espécies de bivalves residentes em regiões de mangue, onde há uma constante variação de salinidade em função dos ciclos de maré, hora com predominância de água do mar no ambiente, hora com predominância de água dos rios. Além disso, a compreensão da influência da salinidade sobre parâmetros bioquímicos e fisiológicos em animais que habitam regiões com grandes variações de salinidade é importante quando se pretende avaliar o significado biológico do impacto de contaminantes nestas regiões. Estudos geoquímicos mostram que a disponibilidade de cádmio, por exemplo, pode crescer com o aumento da salinidade (AMIARDTRIQUET *et al.*, 1998).

Deste modo, da mesma forma que os ciclos de exposição ao ar e re-submersão podem gerar artefatos no estudo de biomarcadores em mexilhões de costão, as variações de salinidade em regiões de mangue podem também comprometer a integridade dos resultados.

1.10. Ritmos biológicos e produção de serotonina, dopamina e melatonina nos organismos

A maioria dos organismos vivos está adaptada a variações circadianas e sazonais do ambiente, ocasionadas pela rotação da Terra em torno do próprio eixo e em torno do sol, através de respostas bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (ritmos biológicos). (FALCÓN, 1999).

É sabido que a retina, o núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo e a glândula pineal são componentes chave dos ritmos circadianos de vertebrados. Em mamíferos, a integridade do NSQ é essencial para a expressão dos ritmos circadianos. O NSQ recebe impulsos da retina através de mecanismos visuais especializados, o que controla a produção de uma série de produtos metabólicos responsáveis pelas alterações rítmicas (COLLIN *et al.*, 1989). Dentre estes produtos rítmicos, em mamíferos destacam-se a melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina, MEL) e a serotonina (5-hidróxitriptamina, 5HT).

A MEL é o principal produto de períodos de escuro em todos os vertebrados investigados e de grande parte dos invertebrados, ou seja, sua biossíntese e liberação são mais altas durante a noite do que de dia. Sua via de síntese a partir do triptofano está esquematizada na figura 1.7.

Durante o dia, fotoreceptores da retina inibem sua síntese na glândula pineal num processo que envolve rodopsina, a qual é constituída por uma proteína transmembrana (opsina) ligada ao 11-*cis*-retinal. Uma vez fotoexcitada, a rodopsina ativa a transducina, uma proteína heterotrimérica. No seu estado inativo, a α -subunidade da transducina está ligada a GDP. Com a sua ativação, GDP é convertido a GTP, o que induz a liberação da α -subunidade das subunidades β e γ . Em sua forma livre, a α -subunidade contendo o GTP ativa uma

fosfodiesterase de membrana, a qual catalisa a hidrólise de GMP cíclico (cGMP), resultando em um decaimento nos níveis de cGMP intracelular. Nos períodos de escuro, cGMP media o abrimento dos canais catiônicos e a entrada de Na^+ e Ca^{2+} nas células. Com a hidrólise do cGMP durante o dia, os canais se fecham, inibindo a liberação de determinados neurotransmissores nas sinapses (FALCÓN, 1998).

Muitos moluscos tais como os bivalves, por não possuírem olhos, possuem um tipo peculiar de fotorecepção extraocular (VERSHININ, 1996), o qual caracteriza-se pelo fato de as células fotosensitivas não estarem organizadas em órgãos complexos como um olho, por exemplo. Estas células são geralmente classificadas em dois tipos: neurônios (fotossensibilidade neuronal) e não-neurônios (fotossensibilidade difusa), tais como células epiteliais e musculares. Os mecanismos da fotorecepção por estes tipos de células são semelhantes aos da retina de vertebrados, envolvendo o metabolismo da rodopsina (TADDEI-FERRETTI *et al.*, 2000).

Entretanto, já foi extensivamente mostrado na literatura que os ritmos biológicos de moluscos bivalves são controlados principalmente por 5HT e L-dopamina (DOPA), um outro neurotransmissor importante derivado do aminoácido tirosina (GIES, 1986; MUNEOKA *et al.*, 1991; DIETZ *et al.*, 1992). Ao que parece, não existe produção de MEL em moluscos bivalves, pois não existem relatos de sua detecção nestes organismos, apesar de que também não existe nenhum trabalho que afirme que bivalves não a produzem. Binkley (1993), por exemplo, relata que os ritmos biológicos de gastrópode do gênero *Aplysia* são regulados principalmente por 5HT.

Figura 1.7. – Síntese da serotonina, 5-metóxitriptamina e melatonina, a partir do aminoácido triptofano. TH: triptofano hidroxilase; AAAD: L-aromático aminoácido descarboxilase; NAT: N-acetiltransferase; HIOMT: hidróxiindol-O-metiltransferase.

É sabido que 5HT e DOPA são encontradas em grandes concentrações em diversos tecidos de muitas espécies moluscos marinhos (ONO *et al.*, 1992). A 5HT regula os períodos de filtragem do mexilhão *Anodonta cygnea*, através da indução do relaxamento do seu músculo adutor, em oposição à noradrenalina, que exerce contração tônica deste músculo (SALANKI *et al.*, 1971; NEMCSÓK *et al.*, 1997). Da mesma forma, 5MT e DOPA também podem causar o relaxamento do músculo adutor de *Mytilus edulis* (MURAKAMI *et al.*, 1998).

Além disso, Ram *et al.* (1999) verificaram que a 5HT causa relaxamento do sifão do mexilhão *Dreissena polymorfa*. Já Fong *et al.* (1994) estimulou a maturação gonadal em *D. polymorfa* pela injeção de 5HT neste mexilhão.

Basicamente, estes produtos rítmicos atuam na regulação de níveis internos de transmissores de sinais tais como AMP cíclico (cAMP) e cGTP bem como na entrada e saída de íons (Na^+ , Ca^{2+}) nas células, podendo atuar também como antagonistas de neurotransmissores nas sinapses (FALCÓN, 1998).

Desta forma, estas moléculas podem regular ritmicamente a atividade de diversos sistemas envolvidos nas respostas do organismo a mudanças ambientais diversas. Sabe-se, por exemplo, que um aumento nos níveis celulares de cAMP em mamíferos pode ocasionar a ativação de genes da enzima SOD (NICOLAY, *et al.*, 1996). Da mesma forma, sabe-se que organismos expostos a poluentes apresentam grandes alterações na atividade nesta enzima, podendo assim haver algum tipo de correlação entre os níveis de 5HT e DOPA com a atividade de enzimas antioxidantes.

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo principal a análise de diferentes parâmetros bioquímicos tais como atividade de enzimas antioxidantes, atividade da acetilcolinesterase, lesões em biomoléculas e níveis de serotonina e dopamina em diferentes tecidos de moluscos bivalves submetidos a diferentes tipos de estresse ambiental. Com isso, pretendia-se avaliar a influência de fatores abióticos não controlados em sistemas comumente utilizados como biomarcadores de poluição, de forma a serem estabelecidos alguns critérios qualitativos que pudessem auxiliar tanto na elaboração de protocolos para a implementação de experimentos quanto na interpretação de resultados obtidos, em estudos de biomonitoramento ambiental da poluição marinha.

Para tanto, este trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

- Análise dos níveis de 8-oxodGuo, MDA e 1,*N*²- ϵ dGuo em glândulas digestivas, brânquias e tecidos do manto de mexilhões *P. perna* de local limpo (referência) e transplantados de um local limpo para poluído, após 12 meses de exposição;
- Análise dos níveis de 8-oxodGuo e MDA em glândulas digestivas e brânquias de mexilhões *P. perna* expostos ao ar por 24 horas, expostos ao ar por 24 horas seguido de re-submersão em água do mar por 3 horas adicionais e permanentemente submersos em água do mar;
- Análise da atividade das enzimas de defesa antioxidantes CAT, GPx, GST e PHGPx, bem como níveis de GSH, MDA e 8-oxodGuo em glândulas digestivas de mexilhões *P. perna* expostos a diferentes metais (Pb, Cd, Cu e Fe), por 12, 24, 72 e 120 horas;
- Análise de MDA em brânquias de ostras *Crassostrea rhizophorae* submetidas a diferentes salinidades e concentrações de óleo diesel;
- Análise de lesões em biomoléculas (MDA e 8-oxodGuo) em bivalves (*Mytella*

guyanensis e *P. perna*) coletados em locais com suspeitas de contaminação ambiental;

- Análise de níveis de 5HT e DOPA em glândulas digestivas e tecidos musculares de mexilhões *P. perna* expostos a diferentes metais (Pb, Cd, Cu e Fe), por 12, 24, 72 e 120 horas;

- Análise de níveis de 5HT e DOPA em glândulas digestivas e tecidos musculares de mexilhões *P. perna* coletados em diferentes períodos do dia, bem como expostos ao ar por 24 horas, expostos ao ar por 24 horas seguido de re-submersão em água do mar por 3 horas adicionais e permanentemente submersos em água do mar;

3. Materiais e Métodos

3.1. Caracterização do material biológico

3.1.1. O mexilhão *Perna perna*

Considerado o maior mitilídeo brasileiro, o *P. perna* (foto 1) é muito abundante entre o litoral do Espírito Santo e Santa Catarina (RIOS, 1985). Segundo Klappenbach (1965), esta espécie possui uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo na Costa Atlântica da América do Sul, da Venezuela ao Uruguai, na Costa Africana do Mediterrâneo Ocidental, de Gibraltar ao Cabo Horn, Costas Europeias do Mediterrâneo Espanhol, na região de Málaga, Costa Atlântica da Mauritânia e Marrocos, na Costa Atlântica da África do Sul e Angola e Costa Índica da África do Sul.

Foto 1 - Aspecto externo do mexilhão *Perna perna*.

3.1.2. A ostra *Crassostrea rhizophorae*

A ostra *Crassostrea rhizophorae* (foto 2) é conhecida popularmente como “ostra-do-mangue”, “gururi”, ou ainda “ostra-gaiteira”, e apresenta uma distribuição geográfica que se estende desde o sul do Brasil até o Caribe (BOFFI, 1979).

Foto 2 – Aspecto externo da ostra da espécie *Crassostrea rhizophorae*.

O crescimento máximo da ostra *C. rhizophorae* alcança 120 mm, vivendo tipicamente nas raízes de vegetações de mangue tais como *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa*, e, ocasionalmente, estando presas à rochas (NASCIMENTO *et al.*, 1980; RIOS, 1985).

3.1.3. O mexilhão *Mytella guyanensis*

Também pertencentes à família *Mytilidae*, os mexilhões da espécie *Mytella guyanensis*, conhecidos como “sururu” ou “mariscos-do-lodo”, vivem também em manguezais, enterrados no lodo, emaranhados entre as raízes da vegetação. Distribuem-se deste a costa do México até o sul do Brasil (Santa Catarina), e chegam a um comprimento máximo de torno de 60 mm (CRUZ. & JIMÉNEZ, 1994).

Foto 3 – Aspecto externo do mexilhão da espécie *Mytella guyanensis*.

3.2. A biologia dos moluscos bivalves

Moluscos bivalves são organismos filtradores e portanto, obtém seu alimento através do batimento ciliar branquial, criando correntes de água para o seu interior. Alimentam-se principalmente de fitoplâncton e matéria orgânica particulada em suspensão, assim como também de zooplâncton (MOREIRA, 1995). São animais sésseis, dióicos, sem dimorfismo sexual externo. A fecundação é externa e a emissão de gametas geralmente ocorre como decorrência de um estresse ambiental, tais como dessecação ou o aumento da temperatura, assim como pela presença de material gamético na água, eliminado por outros indivíduos da população (MOREIRA, 1995).

Após uma fase larval planctônica, os bivalves se fixam em um substrato, onde permanecem até o fim da sua vida. Nos locais de fixação definitiva, os bivalves chegam a formar populações densas em estuários, costões ou regiões de mangue, tanto em pontos de forte arrebentação de ondas como em lugares mais protegidos das mesmas (MOREIRA, 1995).

A figura 3.1., mostra esquematicamente um molusco bivalve aberto, de modo a ilustrar os tecidos que foram avaliados neste trabalho.

Figura 3.1. – Esquema anatômico interno geral de um bivalve, indicando os principais tecidos utilizados neste trabalho. Ao lado, uma foto do aspecto interno do mexilhão *P. perna*. 1: macho; 2: fêmea.

3.3. Coleta dos moluscos bivalves

3.3.1. Experimentos com mexilhões transplantados de um local limpo para local poluído

Mexilhões da espécie *Perna perna* de tamanhos similares foram cedidos pelo Laboratório de Cultivo de Mexilhões da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em colaboração com o professor Afonso Celso Dias Bainy, do departamento de Bioquímica da UFSC.

Estes mexilhões foram presos em redes (dez animais por rede), as quais foram presas a 2 estruturas de PVC com aproximadamente 1m^2 e subdivididos em dois grupos: um grupo

denominado “referência”, que permaneceu submerso na água da zona de cultivo de mexilhões da UFSC na praia de Sambaqui (foto 4 e mapa 1), e um grupo “poluído” que foi transplantado para debaixo da Ponte Hercílio Luz (foto 5 e mapa 1), local de destino do sistema de esgoto do centro urbano da cidade de Florianópolis (SC). Neste último, a estrutura de PVC foi amarrada em um *pier* pertencente ao Grupo de Busca e Salvamento do Corpo de Bombeiros da cidade.

Após 12 meses de exposição (coletas feitas no verão), 10 mexilhões de cada local foram coletados, e tiveram suas respectivas glândulas digestivas, brânquias e tecidos do manto coletados e imediatamente imersos em nitrogênio líquido, de forma a manter a integridade estrutural dos tecidos, para posterior processamento no laboratório do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química, Universidade de São Paulo. Nestes mexilhões, foram avaliados os níveis de 8-oxodGuo, peroxidação lipídica e etenoadutos.

Foto 4 – Zona de cultivo de moluscos bivalves da Universidade Federal de Santa Catarina, localizado na praia de Sambaqui (grupo referência).

Foto 5 – Píer do Corpo de Bombeiros da cidade de Florianópolis, localizado próximo à Ponte Hercílio Luz (ao fundo), no centro da cidade (grupo poluído).

Seis mexilhões foram também coletados no costão rochoso da Praia da Joaquina (ponto 3 do mapa 1), na mesma época das coletas feitas após 12 meses de exposição. Essas coletas foram feitas com o intuito de se comparar os níveis de 8-oxodGuo entre animais de populações naturais (costão rochoso) e de cultivo (animais do grupo referência), uma vez que mexilhões de costão são submetidos a constantes variações ambientais em função dos níveis de maré e batimento de ondas. Mexilhões foram também coletados (glândulas digestivas e tecido do manto) no local referência durante o outono, para se verificar possíveis variações em função dos ciclos reprodutivos destes animais, uma vez que a época de atividade reprodutiva mais intensa desta espécie é no outono (MAGALHÃES, 1998). Nestes animais foram avaliados os níveis de 8-oxodGuo, MDA e etenoadutos, em comparação com os dados de verão.

Mapa 1 – Mapa de Florianópolis, indicando os 3 pontos de coleta: 1) Praia de Sambaqui (grupo referência), 2) Ponte Hercílio Luz (grupo poluído) e 3) Praia da Joaquina (costão rochoso).

3.3.2. Experimento de exposição dos mexilhões a metais pesados

Mexilhões *Perna perna* de tamanhos similares (8-12 cm) foram adquiridos de um cultivo particular localizado na praia de Sambaqui, Florianópolis, SC.

Os mexilhões foram colocados em 5 tanques contendo 25 litros de água do mar cada, a uma temperatura média de 18°C, aerados com o auxílio de dois aeradores, sendo 40 mexilhões por tanque (0,5 litros de água para cada organismo). Após 1 dia de adaptação aos tanques, os mexilhões foram submetidos a diferentes tratamentos. O tanque 1 (grupo I), foi escolhido como grupo controle, sendo que não foi submetido a nenhum tratamento. Ao segundo, terceiro, quarto e quinto tanques, foram adicionados sulfato de ferro II (500 µg/L, de acordo

com VIARENGO *et al.*, 1999), cloreto de cobre (40 µg/L, de acordo com VIARENGO *et al.*, 1997), acetato de chumbo (200 mg/L, de acordo com PRAKASH & RAO, 1995) e cloreto de cádmio (200 µg/L, de acordo com VIARENGO *et al.*, 1997 e PRAKASH & RAO, 1995), respectivamente. A água dos tanques foi trocada diariamente assim como os metais pesados foram adicionados nas mesmas concentrações a cada troca de água do mar.

Após 12, 24, 72 e 120 horas de exposição, 10 mexilhões foram retirados dos tanques, os quais tiveram suas respectivas glândulas digestivas e tecidos musculares dissecados, sendo imediatamente imersos em nitrogênio líquido. Cinco das glândulas digestivas foram utilizadas para análises enzimáticas (CAT, GPx, GST, PHGPx, AChE), e nas cinco restantes foram analisados os níveis de lipoperoxidação, glutatona reduzida, 8-oxodGuo, 5HT e DOPA. Nos músculos foram analisados os níveis de 5HT e DOPA.

3.3.3. Coleta nos diferentes períodos do dia

Com o intuito de se verificar variações circadianas nos níveis de 5HT e DOPA nos mexilhões em função dos períodos de claro e escuro, 44 mexilhões *P. perna*, de tamanhos similares (8-12 cm) foram adquiridos de um cultivo de mexilhões localizado na praia de Sambaqui e colocados em um tanque contendo água do mar (0,5 L por animal), oxigenada com o auxílio de um aerador. Após um dia de aclimação, grupos de 11 mexilhões foram coletados em diferentes horários do dia (10:00, 16:00, 22:00 e 4:00 h), e tiveram suas respectivas glândulas digestivas e tecido muscular coletados e imediatamente imersos em nitrogênio líquido.

3.3.4. Experimento de exposição de mexilhões ao ar

Com o intuito de se verificar o efeito dos ciclos de exposição ao ar e re-submersão nos níveis de 8-oxodGuo, peroxidação lipídica, 5HT e DOPA, 30 mexilhões de tamanhos similares (8-12 cm) foram adquiridos do mesmo cultivo particular como descrito anteriormente e colocados em um tanque contendo 25 L de água do mar, aerado com o auxílio de um aerador. Após um dia de aclimação, dois grupos constituídos de 10 mexilhões cada foram retirados do tanque e deixados fora da água por 24 horas. Os 10 mexilhões restantes permaneceram no tanque com água durante as 24 horas (grupo controle). Após o período de 24 horas, os mexilhões que permaneceram no tanque assim como um dos grupos que permaneceu fora da água tiveram suas respectivas glândulas digestivas e tecidos musculares coletados. O grupo de mexilhões restante, que também ficou fora da água por 24 horas, foi re-submerso em água do mar por 3 horas adicionais quando então tiveram seus tecidos coletados da mesma forma.

3.3.5. Coleta de mexilhões em diferentes pontos do Canal de São Sebastião

Este estudo foi realizado em colaboração com o grupo da professora Eduinetty Ceci P. M. Sousa, do Laboratório de Ecotoxicologia Marinha, Departamento de Oceanografia Biológica do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. O Canal de São Sebastião, situado entre as longitudes 45°19'W e 45°30'W e as latitudes 23°41'S e 23°53,5'S, é margeado a leste pela Ilha de São Sebastião e a oeste pelo continente, onde está localizado o município de São Sebastião (FURTADO *et al.*, 1987).

Mexilhões *Perna perna* (n=5) foram coletados em seis pontos distintos deste Canal : Cigarras (1); Iate Clube de Ilhabela (2), Terminal de petróleo (3), Toque-Toque Pequeno (4) ,

Ponta da Sela (5) e Taubaté - ponto controle localizado fora do Canal (6), de acordo com o mapa 2. Em cada coleta, os animais foram sacrificados e tiveram suas brânquias dissecadas e imediatamente imersas em nitrogênio líquido, para posterior avaliação dos níveis de peroxidação lipídica.

Por sua vez, o grupo da professora Souza avaliou nestes mesmos animais a atividade das enzimas CAT, GST e AChE, assim como foram feitas análises de estabilidade de lisossomos, e o monitoramento dos batimentos cardíacos através de uma sonda de infravermelho, pelo sistema CAPMON (*Computer-Aided Physiological Monitoring*).

Mapa 2 – Mapa mostrando a região do Canal de São Sebastião, indicando os pontos onde os mexilhões foram coletados: 1 – Cigarras; 2 – Iate Clube de Ilhabela; 3 – Estação de Petróleo; 4 – Toque-Toque pequeno; 5 – Ponta da Sela; 6 – Taubaté (controle).

3.3.6. Coleta de mexilhões de mangue (*M. guyanensis*)

Mexilhões *M. guyanensis* foram coletados pelo grupo do professor Wilhelm-Filho em um mangue não poluído (próximo ao rio Ratones, Florianópolis, SC) e numa mangue com suspeitas de contaminação ambiental (mangue do Itacorubi, próximo às imediações da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC). Os mexilhões coletados tinham

comprimentos variando de 5,1 a 7,5 cm, sendo coletados 10 mexilhões em cada ponto. Nas glândulas digestivas destes mexilhões foram avaliados os níveis de 8-oxodGuo. O grupo do professor Wilhelm-Filho analisou em outros mexilhões coletados nestes mesmos locais o conteúdo de metais pesados, as enzimas SOD, CAT, GPx, glutathione redutase (GR), GST e 7-etoxiresorufina-*O*-deetilase (EROD), assim como níveis de peroxidação lipídica, glutathione oxidada (GSSG), glutathione total (GT) e GSH.

3.3.7. Experimento de exposição de ostras *C. rhizophorae* a diferentes salinidades e concentrações de óleo diesel

Este estudo foi feito em colaboração com o grupo do prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), com o intuito de verificar os níveis de peroxidação lipídica em animais expostos a diferentes salinidades e diferentes concentrações de óleo diesel. Por sua vez, o grupo do professor Bainy analisou a atividade das enzimas catalase, glutathione *S*-transferase e acetilcolinesterase nos mesmos animais.

Para tanto, exemplares adultos de ostras de mangue *Crassostrea rhizophorae* (8-10 cm) foram obtidos através da estação do Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM), do Departamento de Aquicultura da UFSC, localizado na praia de Sambaqui, e transportados para um laboratório do LCMM. No laboratório, grupos de 15 indivíduos foram distribuídos em 16 aquários contendo 20 L de água do mar cada, mantidos sob constante aeração e temperatura controlada em 22-23 °C.

Os animais permaneceram por 15 dias nestes aquários, onde passaram por uma mudança gradual nos valores de salinidade, sendo formado no final deste período, 3 grupos de

4 aquários cada, com os valores de salinidade de 35, 25, 15 e 9 ‰.

Após esta etapa, iniciou-se o período de exposição a diferentes concentrações de óleo diesel, que teve duração de uma semana. Neste período, um aquário de cada salinidade foi mantido como controle, enquanto aos outros aquários foram adicionados óleo diesel nas concentrações finais de 0,1, 0,01 e 0,001 %. Após uma semana de exposição, 4 animais de cada salinidade, sob cada concentração de óleo diesel, foram sacrificados e tiveram suas brânquias dissecadas.

Após o término desta etapa, todos os aquários foram limpos e lavados com água fervente, para o início do período da depuração, onde os animais restantes de cada um dos 16 aquários voltaram às mesmas salinidades anteriores, porém sem a adição do óleo diesel. Após 1 e 7 dias mantidos nestas condições (período denominado de depuração), 4 animais de cada grupo foram coletados e tiveram suas respectivas brânquias dissecadas, para posterior análise dos níveis de lipoperoxidação.

Por sua vez, o grupo do professor Bainy analisou a atividade das enzimas CAT, GST e AChE nestes mesmos animais.

3.4. Extração do DNA para análises de 8-oxodGuo e 1,N²- ϵ dGuo

Aproximadamente 500 mg de tecido de cada animal foram homogenizados em 10 mL de tampão A (Sacarose 320 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris HCl 10 mM, desferroxamina 0,1 mM, Triton X 100 1%, pH 7,5), e centrifugados a 1500 x g por 10 minutos. Em seguida, o *pellet* foi ressuspenso em mais 10 mL do tampão A e homogenizado a 1500 X g por 10 minutos.

Após essa primeira etapa, adicionou-se ao pellet 5 mL de tampão B (Tris HCl 10 mM, EDTA-Na₂ 1 mM, Desferroxamina 0,15 mM, pH 8), 180 μ L de SDS 10%, 150 μ L de RNase

A (1 mg/mL de tampão C – Tris HCl 10 mM, EDTA 1mM, desferroxamina 2,5 mM, pH 7,4) e 40 µL de RNase T1 (1U/µL em tampão C) e deixou-se incubando a 50 °C por 30 minutos para digestão do RNA.

Posteriormente foi adicionado 150 µL de proteinase K (20 mg/mL em água MilliQ) e as amostras foram deixadas incubando a 37°C por duas horas para hidrólise das proteínas. As amostras foram então centrifugadas a 5000 x g por 15 minutos e ao sobrenadante adicionou-se 5 mL de solução de NaI (NaI 7,6 M, Tris HCl 40 mM, EDTA-Na₂ 20 mM, desferroxamina 0,3 mM, pH 8,0) e 10 mL de isopropanol 100% para a precipitação do DNA. Em seguida, o DNA foi submetido a lavagens sucessivas com isopropanol 60% e etanol 70% para retirada do excesso de NaI, centrifugando-se a 5000 x g por 15 minutos em cada lavagem. Ao final, o DNA foi diluído em água MilliQ. A medida da concentração de DNA foi feita através das absorbâncias a 260 nm em espectrofotômetro (WANG *et al.*, 1994; HELBOCK *et al.*, 1998).

3.5. Digestão do DNA para análise de 8-oxodGuo e 1,N²-edGuo

Para cada 200 µg de DNA foi adicionado um volume de 4 µL de tampão acetato 1 M pH 4,8 para um volume final de 200 µL (concentração do tampão acetato 20 mM). A este volume foi adicionado Nuclease P1 (5U / 100 µg DNA) e incubado a 37°C por 1 hora. Após este período, foi adicionado tampão Tris HCL pH 7,4 e fosfatase alcalina (10U / 2000 µg DNA) para remoção dos grupos fosfato, incubando-se por 2 horas a 37°C (FIALA *et al.*, 1999).

Em seguida, as amostras foram acrescidas de 1 volume de clorofórmio 100% para a precipitação de impurezas e centrifugadas a 10000 X g por 3 minutos. A fase aquosa (sobrenadante) foi então coletada para a dosagem de 8-oxodGuo.

Para as análises de 1,*N*²-εdGuo nas amostras, o mesmo procedimento de hidrólise foi feito, com a diferença de que 1 pmol do padrão interno marcado isotopicamente com 5 átomos do isótopo 15 do nitrogênio ([¹⁵N₅]-1,*N*²-εdGuo) foi adicionado para cada 200 µg de DNA.

3.6. Coleta e dosagem dos adutos 1,*N*²-εdGuo por HPLC acoplado a espectrometria de massas

Para as análises de 1,*N*²-εdGuo nos DNAs dos tecidos de mexilhões do experimento de mexilhões transplantados de um local referência para local poluído, os adutos foram previamente purificados por HPLC, como segue. Um padrão concentrado (65 pmol/µL) de 1,*N*²-εdGuo foi injetado no HPLC, e seu tempo de retenção (aproximadamente 12 minutos) foi anotado. Em seguida, 400 µg de DNA, contendo 2 pmol do padrão interno isotopicamente marcado, foram injetados no HPLC e coletados no mesmo tempo de retenção observado para o padrão previamente injetado.

As condições de HPLC para este processo foram: coluna semi-preparativa Luna 10 C18 (250 mm x 10 mm i.d., 10 µm) da Phenomenex. Gradiente linear de acetonitrila, 0-5 minutos: 5% acetonitrila; 5-30 minutos 5% a 50% acetonitrila. O fluxo utilizado foi de 4,7 mL/min. A absorbância foi monitorada a 225 nm.

Em seguida, as amostras coletadas foram liofilizadas e ressuspensas em 1mL de água e transferidas para *eppendorfs*. Este volume foi seco em um *Speed Vac* (Savant) e o resíduo diluído em 19 µL de água MilliQ. A este volume adicionou-se 1 µL de ácido fórmico 2% (concentração final = 0,2 %). 10 µL desta solução foram injetadas no espectrômetro de massas para a dosagem de 1,*N*²-εdGuo (correspondendo a 200 µg de DNA hidrolisado contendo 1

pmol do padrão interno marcado).

As análises dos etenoadutos por HPLC acoplada a espectrometria de massas no módulo *electrosprayionization* (HPLC/ESI/MS) positivo foram feitas em um espectrômetro Quattro II (Micromass, Altrincham, U.K.), de acordo com Loureiro *et al.* (2000), com algumas modificações.

Nas amostras do experimento de transplante dos mexilhões de local limpo para poluído, uma bomba LC10AD da Shimadzu foi utilizada para bombear a fase móvel (água/acetonitrila, 70:30 vol.), a um fluxo de 7 $\mu\text{L}/\text{min}$, diretamente no espectrômetro, para a aquisição dos espectros de massas. Para a detecção de 1, N^2 - ϵdG , utilizou-se a função MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), a qual é específica para monitorar a fragmentação do íon pai para o íon filho, no caso, $m/z = 292$ para $m/z = 176$. Nesta função utiliza-se o primeiro analisador, a câmara de colisão, o segundo analisador e o último detector (MS-MS). O primeiro analisador seleciona apenas os íons de massa 292, que corresponde à massa do aduto 1, N^2 - ϵdGuo . Na câmara de colisão, o aduto é fragmentado e perde o seu açúcar ficando com uma massa de 176, a qual é selecionada pelo segundo analisador. O último detector detecta os compostos de massa 176 selecionados no segundo analisador. Em outro canal, monitora-se as transições do padrão interno, ou seja, as transições de $m/z = 297$ (massa do etenoaduto isotopicamente marcado) para 181 (perda da 2-desoxiribose).

A voltagem utilizada para o cone foi 15 V, a energia de colisão utilizada foi de 10 eV (gás de colisão: argônio; pressão do gás de colisão: 6,7 mBar), e a temperatura da fonte foi de 100 °C. A coluna de separação utilizada foi uma coluna capilar Luna C18 (150 mm x 1 mm i.d., 3 μm) da Phenomenex. A aquisição dos dados foi feita através do *software* Masslynx 3.2.

Nas análises feitas nos mexilhões coletados no outono, um método diferente de detecção dos adutos foi utilizado, o qual apresentava a vantagem de não ser necessária a pré-purificação dos adutos por HPLC semi-preparativa. Neste método (Loureiro *et al.*, 2002), um sistema de HPLC da Shimadzu, consistindo de autoinjeter (SIL-10AD/VP), válvula automática (FCV-12AH), duas bombas (Class LC 10AD), detector de UV SPD-10AV/VP, controlados por um comunicador SCL-10A/VP-CBM 10A e o software Class VP 5.032 foram utilizados para a separação do aduto e limpeza da coluna (Luna C18(2) 250 X 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex, Torrance, CA). Uma terceira bomba (LC-10AD, Shimadzu) foi usada para simultaneamente bombear a fase móvel (isocrático, 0,05 mL/min de 50:50 % ácido fórmico 0,1% /acetonitrila) através da segunda coluna (C18(2) Phenosphere-Next 150 x 2 mm, 3 µm, Phenomenex). Até 24 minutos, o eluente proveniente da primeira coluna saía diretamente para um descarte. A partir de 24 minutos, a válvula mudou a posição de saída do eluente para o descarte para a segunda coluna, para a passagem do aduto na mesma. Em 35 minutos, a válvula retornou a posição inicial, e os solventes eluídos limpam a primeira coluna. Enquanto isso, a terceira bomba eluiu o aduto através da segunda coluna, de forma que este entrasse no espectrômetro de massas. As amostras hidrolisadas de DNA continham 1 pmol do aduto isotopicamente marcado ($[^{15}\text{N}_5]$ -1, N^2 - ϵ dGuo) para cada 200 µg de DNA, e foram injetadas de acordo através do autoinjeter. A detecção dos adutos no espectrômetro de massas no módulo MRM obedeceu a mesma metodologia descrita acima.

3.7. Detecção das bases oxidadas do DNA por HPLC acoplado a detecção eletroquímica

A quantidade de 8-oxodGuo foi determinada nos mexilhões por HPLC acoplado a um detector eletroquímico digital Decade (Antec, Leiden, Netherlands) com um potencial de

+ 0,6 V (amostras de mexilhões coletados no costão da Joaquina) ou em um detector eletroquímico coulométrico ESA com potenciais de 0,12 e 0,28 V para os eletrodos 1 e 2 respectivamente (restante das amostras). A fase móvel consistia de fosfato de potássio 50 mM, pH 5,5 contendo 8 % de metanol e bombeado a um fluxo de 1 mL/min por uma bomba Shimadzu modelo LC-10AD/VP (Shimadzu Co., Tokyo, Japan). Para processar e calcular a área dos picos foi utilizado o software Shimadzu Class-VP versão 1.0.

O detector UV/Vis (UV SPD-10AV/VP) foi programado para detecção da dGuo em comprimento de onda de 254 nm. A coluna usada foi a LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) da Supelco. A fase móvel consistia de fosfato de potássio 50 mM, pH 5,5, contendo 8 % metanol, com fluxo de 1 mL/min.

3.8. Análises enzimáticas

3.8.1. Processamento das amostras

As glândulas digestivas dos mexilhões foram pesadas e homogeneizadas com cinco vezes o volume de tampão de homogeneização (Tris.HCl 50 mM, 0,15 M KCl, pH 7,4) contendo inibidor de proteases, e centrifugadas a velocidade de 10.000g durante 20 minutos. A fração sobrenadante foi submetida a uma segunda centrifugação de 40.000g por 60 minutos para obtenção da fração citosólica conforme Lu *et al.* (1969). Nesta fração foram analisadas a atividade das enzimas CAT, GPx, PHGPx, GST e AChE.

3.8.2. Catalase (CAT)

A técnica utilizada para medir a atividade da CAT foi a descrita por Beutler (1975) que

quantifica a velocidade de decomposição da H_2O_2 pela enzima, através do decréscimo de absorbância à 240 nm ($\varepsilon = 0,071 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) à 30 °C.

3.8.3. Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi analisada pelo método de Keen *et al.* (1976). A amostra foi adicionada em um meio de reação contendo 100 μM 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 100 μM de GSH em meio contendo tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0. O aumento de absorbância foi acompanhado a 340 nm.

3.8.4. Glutathione peroxidase

A atividade da GPx foi medida pela técnica descrita por Sies *et al.* (1979). Este método se baseia na medida do decréscimo de absorbância, promovido durante a redução da GSSG, catalisada pela GR, em presença de NADPH. O meio de reação continha tampão fosfato de potássio 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 7,0, NADPH 20 mM, GR 0,1 U/mL e glutathione reduzida 0,1 M. O decréscimo na absorbância foi registrado no comprimento de onda de 340 nm, à 30°C.

3.8.5. Glutathione peroxidase específica para hidroperóxidos de fosfolipídeos

A atividade da enzima PHGPx foi medida através do método descrito por Maiorino *et al.* (1990) e Yamamoto & Takahashi (1993), usando o hidroperóxido da fosfatidilcolina (FCOOH) como substrato, o qual foi preparado através da oxidação de fosfatidilcolina de gema de ovo (tipo III-E, Sigma-Aldrich CO, St Louis, MO), usando lipoxigenase de soja, de acordo com Terao *et al.* (1992) e Arai *et al.* (1997).

Para tanto, 200 μ L de uma solução de 100 mg da fosfatidilcolina de ovo diluídos em 1 mL de hexano, foram colocadas em um tubo de centrifuga contendo 0,162 g (390 nmol) de desoxicolato de sódio, e agitados por 1 min. O solvente foi então evaporado sob nitrogênio e 24 mL de tampão borato 200 mM, pH 9,0 foram adicionados, e a solução foi agitada por 1 min e em seguida sonicada também por 1 min. Na sequência, 10 mg de lipoxigenase de soja diluídos em 2 mL do tampão borato foram adicionados à solução, que foi então incubada no escuro por 1 hora, sob aeração e agitação.

Os hidroperóxidos foram então extraídos, adicionando-se 28 mL de solução de clorofórmio/metanol (1:1), seguido de centrifugação a 1000 x g, por 5 min. A fração de clorofórmio foi então coletada e o processo de extração foi repetido duas vezes. Após este processo, o solvente foi evaporado sob nitrogênio, e posteriormente dissolvido em 2 mL de solução clorofórmio:metanol:água (1:10:0,5). Esta solução foi injetada em um sistema de HPLC constituído de duas bombas LC-10ADVP, um detector *photodiodearray* modelo SPD-M10AVP, e um controlador SCL-10AVP (Shimadzu), utilizando como fase móvel consistia de duas bombas LC-10ADVP, um detector *photodiodearray* modelo SPD-M10AVP, e um controlador SCL-10AVP (Shimadzu), e os picos relativos aos hidroperóxidos da fosfatidilcolina foram coletados. Os picos foram monitorados em 234 nm, com o auxílio do programa Class VP 6.12. A coluna utilizada foi uma LC-8 (150 x 6,5 mm, 5 μ m de diâmetro de poro). A fase móvel consistia de clorofórmio:metanol:água (1:10:0,5), bombeada sob fluxo de 1 mL/min.

Ao final, as frações coletadas foram secas por rota-evaporação e diluídas em clorofórmio:metanol (95:5), e estocada a -20°C . Uma alíquota desta solução foi retirada para a quantificação dos hidroperóxidos de fosfatidilcolina, pelo método de quantificação de

fósforo. À alíquota foi adicionado 0,4 mL de ácido perclórico 70 %, e esta solução foi aquecida a 180 °C por uma hora. Na sequência, 4,2 mL de água, 0,2 mL de molibdato de amônia 5 % e 0,2 mL de solução amidol (0,2 g de amidol [2,4-diaminofenol dihidrocloro] dissolvidos em bisulfito de sódio 20 %), e a solução foi aquecida a 100 °C por 7 min, gerando uma solução de cor azul. Esta solução foi lida em 830 nm, e a quantificação do fósforo se deu utilizando uma solução de KH_2PO_4 como padrão.

Os ensaios enzimáticos foram idênticos aos da enzima GPx, entretanto ao invés de ser adicionado *t*-butil hidroperóxido à cubeta contendo meio de reação e amostra, foi adicionado o hidroperóxido da fosfatidil colina como substrato (tipicamente entre 15 – 25 $\mu\text{mol/mL}$ de meio de reação).

3.8.6. Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da enzima AChE foi medida de acordo com metodologia descrita por Ellman *et al.*, (1961), o qual está baseado na reação entre o produto da hidrólise do substrato acetiltiocolina, com o ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), em pH 8,0. A reação foi monitorada a 412 nm durante 3 minutos a 25 °C.

3.8.7. Determinação da concentração de proteína

A determinação da quantidade de proteína na fração celular citosólica foi realizada segundo o método de Lowry modificado (PETERSON, 1977), utilizando albumina bovina como padrão.

3.9. Lipoperoxidação

Nas amostras de mexilhões coletadas em local referência e poluído, a análise utilizada para avaliar a peroxidação lipídica foi a reação do produto da peroxidação lipídica malondialdeído, com o ácido tiobarbitúrico, e leitura em espectrofotômetro em 535 nm. Aproximadamente 100 mg de amostra foram homogenizadas em 50 volumes de sacarose 0,25 M. A 500 µL do homogenato foi adicionado 1,5 mL de tampão acetato 200 mM, pH 3,75, 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1%, 100 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e 400 µL de água MiliQ para completar um volume final de 4 mL. As amostras foram então incubadas por uma hora em água fervente e ao final a reação do MDA com o TBA formou uma solução cor-de-rosa. Os adutos de MDA-TBA foram então extraídos com 2mL de *n*-butanol e a absorbância lida à 532 nm num espectrofotômetro (Hitachi).

Entretanto diversas críticas tem sido atribuídas a esta técnica por muitos autores, em função de existir uma série de outros compostos endógenos que também reagem com o TBA, e que por isso podem interferir nos resultados. Para contornar esse problema, nas demais amostras deste trabalho resolvemos por adotar a técnica de dosagem de MDA por HPLC/UV proposta por Hong *et al.* (2000). Aproximadamente 200 mg de tecido foram homogenizadas em 1,5 mL de solução de sacarose 250 mM, contendo 0.05% de BHT (butylated hydroxytoluene) como agente antioxidante. Posteriormente 200 µL de solução SDS 10% e 500 µL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,4 % diluído em HCl 0,2 M foram adicionados, e as amostras foram então incubadas por 45 min à 90 °C. Após este período, as amostras de MDA-TBA foram extraídas com 1 mL de *n*-butanol e diretamente injetadas (10 µL) no HPLC e monitoradas à 532 nm. A fase móvel consistia de solução fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,0 com 40% metanol, bombeada isocraticamente (1mL/min). O sistema de

HPLC consistia de duas bombas LC-10ADVP, um detector *photodiodearray* modelo SPD-M10AVP, e um controlador SCL-10AVP (Shimadzu). Os picos foram monitorados com o auxílio do programa Class VP 6.12. A coluna utilizada foi uma Supelcosil LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro de poro).

3.10. Análise de 5HT e DOPA por HPLC acoplada a detecção eletroquímica

Os tecidos foram homogeneizados (1:4 vol.) em solução fosfato de potássio monobásico 25 mM, 0,1% ácido fórmico, 5% acetonitrila, pH 2,9. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas a 5000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado, filtrado e injetado (20 µL) no HPLC. O sistema de HPLC consistia de coluna SUPELCOSIL LC18 (150 x 4,6 mm, 5 µm, Supelco), duas bombas modelo LC-10AD, um detector ultravioleta SPD-10AV, e um controlador CBM-10A da Shimadzu. A fase móvel consistia da mesma solução utilizada para a homogenização das amostras. O detector eletroquímico utilizado foi o detector amperométrico digital Decade (Antec, Leiden, Netherlands). Voltamogramas tanto da serotonina quanto da DOPA foram construídos com o intuito de se verificar o potencial mais adequado para a obtenção de um melhor sinal. Isto foi feito injetando-se 5 pmol de padrões dos dois compostos no HPLC, variando-se os potenciais de 0,4 a 0,9 volts.

3.11. Dosagem de glutathiona reduzida (GSH)

Para as análises de glutathiona reduzida, amostras de glândulas digestivas foram homogeneizadas em 5 volumes de ácido perclórico 1 M contendo EDTA 2 mM e centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi então filtrado e diretamente injetado (20 µL) no HPLC acoplado a detector eletroquímico amperométrico digital

Decade (Antec, Leiden, Netherlands), ajustado em 0,7 V. O sistema de HPLC era constituído de 2 bombas LC10A, um detector UV SPD-10AV e uma controladora CBM-10 A da Shimadzu. A coluna utilizada foi uma Supelcosil LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel utilizada foi solução de fosfato de potássio monobásico 25 mM, com 0,1% ácido fórmico, pH 2,9 e bombeada sob fluxo de 1 mL/min.

3.12. Análises estatísticas

As análises estatísticas dos resultados foram feitas com o auxílio do *software* Microcal Origin 6.0 (Northampton, MA, USA). Os resultados são expressos como médias $\pm$ desvios padrões. Diferenças significativas entre diferentes grupos foram estudadas usando testes *t* e análises de variância de uma via, e somente $p < 0,05$ foi aceito como significativo.

4. Resultados

4.1. Avaliação dos níveis de 8-oxodGuo, peroxidação lipídica e de 1,N²-edGuo nos mexilhões transplantados de um local limpo para local poluído.

A figura 4.1., apresenta os níveis de 8-oxodGuo encontrados nas glândulas digestivas, brânquias e tecido do manto de mexilhões coletados nos locais poluído e referência. Mexilhões de local poluído apresentaram níveis significativamente maiores desta lesão nas glândulas digestivas e brânquias, em relação ao grupo referência. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tecidos do manto.

Na figura 4.2., temos os níveis de peroxidação lipídica encontrados neste mesmo experimento. Nenhuma diferença foi observada entre as glândulas digestivas e brânquias de animais referência e do local poluído. Entretanto, mexilhões de local poluído apresentaram níveis significativamente maiores de peroxidação lipídica no tecido do manto, quando comparados com animais do grupo referência.

Os níveis de 1,N²-edGuo encontrados em glândulas digestivas e tecido do manto de mexilhões dos grupos poluído e referência estão representados na figura 4.3. Este parâmetro não foi analisado nas brânquias devido à pouca quantidade de DNA disponível para as análises. Não houve diferença estatística entre as glândulas digestivas dos grupos poluído e referência. Por outro lado, mexilhões do local poluído apresentaram níveis mais elevados de 1,N²-edGuo no tecido do manto do que os animais do grupo referência.

Figura 4.1. – Níveis de 8-oxodGuo em glândulas digestivas, brânquias e tecido do manto de mexilhões *P. perna* coletados nos locais poluído e referência, após 12 meses de exposição. * Indica diferença estatística ($p < 0,05$).

Figura 4.2. – Níveis de MDA em glândulas digestivas, brânquias e tecido do manto de mexilhões *P. perna* coletados nos locais poluído e referência, após 12 meses de exposição. * Indica diferença estatística ($p < 0,05$).

Figura 4.3. - Níveis de 1,N²-εdGuo em glândulas digestivas e tecido do manto de mexilhões *P. perna* coletados nos locais poluído e referência, após 12 meses de exposição. * Indica diferença estatística (p<0,05).

4.2. Avaliação dos níveis de 8-oxodGuo, peroxidação lipídica e de 1,N²-edGuo nos mexilhões coletados no outono

De forma a se verificar possíveis variações em função do maior pico reprodutivo dos mexilhões no outono nos níveis de 8-oxodGuo, MDA 1,N²-edGuo, mexilhões foram coletados nesta estação do ano, no local referência (Sambaqui). A figura 4.4. apresenta os resultados referentes a este experimento. Os mexilhões coletados no outono apresentaram níveis significativamente maiores de 8-oxodGuo e MDA tanto na glândula digestiva como no manto, em relação aos animais coletados no verão. Por outro lado, os mexilhões coletados no verão apresentaram maiores níveis de 1N²-edGuo nas glândulas digestivas.

4.3. Análise de 8-oxodGuo em mexilhões *P. perna* de costão

Paralelamente às coletas feitas de mexilhões de local poluído e referência, depois de 12 meses de exposição, foram coletados mexilhões em um costão rochoso da praia da Joaquina para a padronização de técnicas de extração de DNA e dosagem de 8-oxodGuo nas glândulas digestivas destes animais. Os dados referentes a estas análises estão expressos na figura 4.5., e os valores encontrados nestes mexilhões foram significativamente maiores que os observados nos animais de cultivo.

Figura 4.4. – Níveis de 8-oxodGuo, MDA e 1,N²-εdGuo em glândulas digestivas (GD) e tecido do manto de mexilhões *P. perna* coletados no verão e no outono. * indica diferença estatística (P < 0,05).

Figura 4.5. – Níveis de 8-oxodGuo em glândulas digestivas de mexilhões *P. perna* de costão rochoso e de cultivo. * indica diferença estatística ($P < 0,05$).

4.4. Exposição dos mexilhões ao ar, seguido de re-submersão

Na figura 4.6., são apresentados os dados referentes às análises de MDA e 8-oxodGuo em glândulas digestivas e brânquias de animais controle, expostos ao ar por 24 horas e expostos ao ar por 24 horas seguidos de re-submersão em água do mar por 3 horas adicionais.

Animais expostos ao ar apresentaram níveis significativamente maiores de MDA na glândula digestiva e brânquia, e de 8-oxodGuo na brânquia, em relação ao grupo controle. Após 3 horas de re-submersão, os níveis de MDA e 8-oxodGuo tanto nas glândulas digestivas quanto nas brânquias foram similares aos valores encontrados no grupo controle.

Figura 4.6. – Níveis de 8-oxodGuo e MDA em brânquias e glândulas digestivas de mexilhões controle, após 24 horas de exposição ao ar (Exposto 24 h) e após 3 h de re-submerção (Re-submerso). * indica diferença estatística ($p < 0,05$). N=5.

4.5. Exposição de ostras *C. rhizophorae* a diferentes salinidades e concentrações de óleo diesel

A tabela 4.1., apresenta os dados de MDA em brânquias de ostras do mangue expostas a diferentes concentrações de óleo diesel em diferentes salinidades. Sob concentrações de 0,01 e 0,1 % de óleo diesel nas salinidades 9 e 15 ‰, e concentrações de 0,001, 0,01 e 0,1 % de óleo diesel na salinidade 35 ‰, os mexilhões apresentaram níveis significativamente maiores de peroxidação lipídica em relação aos seus respectivos grupos controle. Na salinidade de 25 ‰, bem como após os dois períodos de depuração, nenhuma diferença foi observada nos níveis de peroxidação lipídica.

Tabela 4.1. – Níveis de MDA (nmol / g tecido) em ostras de mangue *C. rhizophorae* expostas a diferentes salinidades e diferentes concentrações de óleo diesel, e após 1 e 7 dias de depuração.

Salinidade (‰)	Óleo diesel (%)	Expostos 7 dias	Depuração 1 dia	Depuração 7 dias
9	0	4,12 ± 1,54 (4)	6,45 ± 0,83 (4)	8,90 ± 3,01 (4)
9	0,001	5,93 ± 1,47 (4)	8,03 ± 0,56 (3)	9,45 ± 3,12 (4)
9	0,01	*12,58 ± 2,77 (4)	7,65 ± 0,81 (4)	8,53 ± 1,90 (3)
9	0,1	*8,98 ± 2,24 (4)	6,79 ± 1,95 (4)	8,39 ± 1,21 (4)
15	0	7,04 ± 2,30 (4)	8,07 ± 0,55 (3)	7,13 ± 0,90 (4)
15	0,001	3,88 ± 0,52 (4)	7,60 ± 1,71 (4)	7,10 ± 1,04 (3)
15	0,01	*17,75 ± 4,97 (3)	8,12 ± 1,36 (4)	7,78 ± 1,25 (2)
15	0,1	*15,88 ± 2,36 (3)	6,95 ± 1,44 (4)	6,35 ± 0,78 (2)
25	0	9,67 ± 3,83 (4)	12,35 ± 3,45 (4)	8,14 ± 3,08 (3)
25	0,001	7,98 ± 1,36 (4)	9,82 ± 2,29 (3)	5,75 ± 0,72 (4)
25	0,01	10,48 ± 2,28 (4)	ND	7,83 ± 1,70 (4)
25	0,1	10,86 ± 1,25 (3)	9,62 ± 1,21 (4)	8,12 ± 1,31 (4)
35	0	4,52 ± 0,90 (4)	8,46 ± 0,68 (4)	5,44 ± 2,28 (3)
35	0,001	*12,40 ± 0,39 (2)	9,48 ± 2,36 (4)	6,30 ± 1,16 (4)
35	0,01	*9,10 ± 4,59 (3)	7,37 ± 1,67 (3)	7,22 ± 1,61 (4)
35	0,1	*10,67 ± 2,28 (3)	ND	ND

Dados expressos como média ± desvio padrão. * indica diferença estatística em relação à concentração 0% de óleo diesel. Números entre parênteses indicam o número de exemplares analisados. ND = não determinado.

4.6. Análise da peroxidação lipídica nas brânquias de mexilhões *P. perna* coletados no Canal de São Sebastião

A figura 4.7. mostra os dados relativos às análises de MDA em brânquias de mexilhões *P. perna* coletados em diferentes pontos do Canal de São Sebastião. Dentre os diferentes pontos, os mexilhões coletados no ponto 4 (Toque-toque Pequeno) foram os únicos que apresentaram maiores níveis de MDA, em relação ao grupo controle 6.

Figura 4.7. – Níveis de TBARs em brânquias de mexilhões *P. perna*, coletados em diferentes pontos do Canal de São Sebastião: 1 – Cigarras; 2 – Iate Clube de Ilha Bela; 3 – Terminal de Petróleo; 4 - Toque-toque Pequeno; 5 – Ponta da Sela; 6 – Taubaté (controle). Acima, mapa do Canal de São Sebastião, indicando os pontos de coleta. * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (6). N=5.

4.7. Níveis de 8-oxodGuo em glândula digestiva do mexilhão de mangue *Mytella guyanensis*

Mexilhões de mangue *M. guyanensis* coletados no mangue do Itacorubi (poluído), apresentaram maiores níveis de 8-oxodGuo do que animais coletados no local referência, como mostra a figura 4.8.

Figura 4.8. – Níveis de 8-oxodGuo encontrados nas glândulas digestivas de mexilhões *M. guyanensis* coletados em um local referência e num poluído. Acima, mapa indicando os pontos de coleta do grupo referência (Ratones) e poluído (Itacorubi). * indica diferença estatística (P<0,05).

4.8. Experimento de exposição de mexilhões a metais pesados

4.8.1. Avaliação da atividade da enzima AChE.

A figura 4.9. apresenta os dados referentes a atividade da AChE em glândulas digestivas de mexilhões expostos a cobre, ferro, cádmio e chumbo. Mexilhões expostos a cádmio apresentaram um aumento bastante acentuado da atividade da AChE após 72 horas de exposição, em relação ao grupo controle. Além disso, mexilhões expostos a chumbo também apresentaram uma atividade significativamente maior da AChE após 12 horas de exposição, em relação ao grupo controle.

Figura 4.9. – Atividade da AChE em glândulas digestivas de mexilhões *P. perna* expostos a ferro (Fe), chumbo (Pb), cobre (Cu) e cádmio (Cd). * indica diferença estatística ($P < 0,05$).

4.8.2. Avaliação da atividade das enzimas GST, CAT, GPx, PHGPx, e níveis de GSH, MDA e 8-oxodGuo em mexilhões expostos aos diferentes metais

A figura 4.10 apresenta as atividades das enzimas GST, CAT, GPx e PHGPx, assim como os níveis de GSH e MDA em glândulas digestivas de mexilhões *P. perna* expostos a cobre. Estes mexilhões apresentaram maior atividade da CAT e maiores níveis de MDA após 120 horas de exposição, maior atividade da PHGPx após 12 e 24 horas de exposição e menor conteúdo de GSH após 72 horas de exposição, em relação aos seus respectivos grupos controle. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os mexilhões expostos a cobre e os grupos controle em relação às atividades da GPx e GST.

Mexilhões expostos a cádmio (figura 4.11.) tiveram maior atividade da CAT após 120 horas de exposição, maior atividade da PHGPx após 24 e 120 horas, menor atividade da GPx após 12, 24 e 72 horas e menor conteúdo de GSH assim como maiores níveis de MDA após 12 horas de exposição, em relação aos grupos controle. Também não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos controle e mexilhões expostos a cádmio em relação à atividade da GST.

Na figura 4.12., são apresentados os dados referentes aos mexilhões expostos a ferro. Os mexilhões expostos a este metal por 120 horas apresentaram maior atividade da CAT, menor conteúdo de GSH e maiores níveis de MDA, em relação aos grupos controle. Em todos os períodos de exposição foi observada maior atividade da PHGPx, nos mexilhões expostos a ferro. Igualmente aos mexilhões expostos a cobre, não houveram diferenças estatísticas para as atividades da GST e GPx.

Os dados referentes às análises nos mexilhões expostos a chumbo são apresentados na figura 4.13. Os mexilhões expostos a este metal por 120 horas apresentaram maior atividade da CAT e da GPx. Maiores atividades da PHGPx foram observadas após 12, 24 e 120 horas de

exposição ao chumbo, assim como estes mexilhões apresentaram menor conteúdo de GSH após 12 horas de exposição, em relação aos grupos controle. Nenhuma diferença estatística foi observada quanto a atividade da GST e os níveis de MDA.

Correlações negativas significativas foram encontradas entre a atividade da enzima PHGPx e os níveis de peroxidação lipídica nos mexilhões expostos a cobre e ferro (figura 4.14.). Quanto maior a atividade da PHGPx menores foram os níveis de peroxidação lipídica e vice-versa.

Quanto aos níveis de 8-oxodGuo, foram feitas análises nos mexilhões expostos a ferro, chumbo e cádmio por 24 horas, sendo que os animais expostos a chumbo e cádmio apresentaram níveis maiores de 8-oxodGuo em relação ao grupo controle (figura 4.15.).

Figura 4.10. - Atividades das enzimas GST, CAT, GPx e PHGPx, e níveis de GSH e MDA em glândulas digestivas de mexilhões *P. perna* expostos a cobre (Cu). * indica diferença estatística em relação aos grupos controle ($P < 0,05$).

Figura 4.11. - Atividades das enzimas GST, CAT, GPx e PHGPx, e níveis de GSH e MDA em glândulas digestivas de mexilhões *P. perna* expostos a cádmio (Cd). * indica diferença estatística em relação aos grupos controle ($P < 0,05$).

Figura 4.12. - Atividades das enzimas GST, CAT, GPx e PHGPx, e níveis de GSH e MDA em glândulas digestivas de mexilhões *P. perna* expostos a ferro (Fe). * indica diferença estatística em relação aos grupos controle ($P < 0,05$).

Figura 4.13. - Atividades das enzimas GST, CAT, GPx e PHGPx, e níveis de GSH e MDA em glândulas digestivas de mexilhões *P. perna* expostos a chumbo (Pb). * indica diferença estatística em relação aos grupos controle ($P < 0,05$).

Figura 4.14 – Curvas de correlação entre as atividades da PHGPx e níveis de peroxidação lipídica encontrados nos mexilhões expostos a Fe e Cu.

Figura 4.15. - Níveis de 8-oxodGuo em glândulas digestivas de mexilhões *P. perna* do grupo controle e expostos a ferro (Fe), chumbo (Pb) e cádmio (Cd), por 24 horas. * indica diferença estatística ($p < 0,05$), em relação ao grupo controle.

4.8.3. Análise de serotonina (5HT) e dopamina (DOPA) em músculos de mexilhões expostos à metais pesados

A figura 4.16. apresenta os voltamogramas obtidos da injeção de 5 pmol de 5HT e de DOPA, variando-se os potenciais. Com base no voltamograma, o potencial escolhido para as análises foi de 0,7 Volts, uma vez que foi onde obteve-se o melhor sinal para os dois compostos.

Figura 4.16. – Voltamogramas da injeção de 5 pmol de serotonina (A) e 5 pmol de dopamina (B).

A figura 4.17. apresenta os níveis de 5HT e DOPA nos músculos do mexilhão *P. Perna* expostos aos diferentes metais. Comparando-se os diferentes grupos, ao longo do tempo, podemos observar que após 24 horas de exposição a ferro e após 24 e 72 horas de exposição a chumbo e a cádmio, os mexilhões apresentaram menores níveis de 5HT no músculo. Por outro lado, mexilhões expostos a ferro por 12 horas apresentaram níveis significativamente maiores de serotonina em relação ao grupo controle.

Mexilhões expostos a chumbo por 24, 72 e 120 horas, assim como expostos a cobre por 120 horas e a ferro por 24 horas também apresentaram níveis significativamente menores de DOPA no músculo. Por outro lado, mexilhões expostos aos 4 metais por 12 horas apresentaram um aumento significativo nos níveis de DOPA em relação aos grupos controle.

Efeitos semelhantes foram observados nas glândulas digestivas destes mesmos mexilhões (figura 4.18.). Mexilhões expostos a cobre e ferro por 24 horas apresentaram maiores níveis de 5HT neste tecido. Após 72 horas de exposição a cobre e cádmio e 72 e 120 horas de exposição a chumbo e ferro, os níveis de 5Ht foram significativamente mais baixos que os níveis encontrados nos grupos controle.

Com relação aos níveis de DOPA nas glândulas digestivas, mexilhões apresentaram um aumento significativo deste composto após 12 horas de exposição a chumbo, cádmio e ferro, assim como um decréscimo significativo após 120 horas de exposição a chumbo, em relação aos grupos controle.

Figura 4.17. – Níveis de 5HT e DOPA em tecido muscular de mexilhões *P. perna* expostos a chumbo (Pb), cobre (Cu), cádmio (Cd) e ferro (Fe). * indica diferença estatística em relação ao grupo controle ($P < 0,05$).

Figura 4.18. - Níveis de 5HT e DOPA em glândulas digestivas de mexilhões *P. perna* expostos a chumbo (Pb), cobre (Cu), cádmio (Cd) e ferro (Fe). * indica diferença estatística em relação ao grupo controle ($P < 0,05$).

4.9. Análises de 5HT e DOPA nos mexilhões coletados em 4 diferentes horários do dia e expostos ao ar

Na figura 4.19. temos os perfis dos níveis de 5HT e DOPA em glândulas digestivas e em músculos de mexilhões coletados em diferentes períodos de um mesmo dia. Como pode-se notar, nenhuma diferença foi observada nos níveis de DOPA e 5HT em GD e no músculo, repectivamente, nos diferentes períodos do dia. Entretanto mexilhões coletados às 4:00 horas apresentaram níveis de 5HT significativamente maiores na glândula digestiva, em relação aos outros grupos, assim como níveis significativamente maiores de DOPA no tecido muscular, em relação ao grupo coletado às 16:00 horas.

Figura 4.19. – Níveis de 5HT e DOPA em glândulas digestivas de mexilhões coletados em diferentes horários de um dia. Letras iguais indicam valores iguais; letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Mexilhões expostos ao ar por 24 horas apresentaram níveis significativamente menores de DOPA e 5HT no músculo, e nenhuma diferença nas glândulas digestivas (figura 4.20.). Após 24 horas de exposição ao ar seguido de re-submersão na água por mais 3 horas, os níveis de 5HT no músculo foram similares aos valores encontrados no grupo controle nos músculos, entretanto os níveis de DOPA permaneceram menores.

Figura 4.20. – Níveis de 5HT e DOPA em tecido muscular de mexilhões controle (1), expostos ao ar por 24 horas (2), e expostos ao ar por 24 horas seguido de re-submersão em água do mar por 3 horas adicionais (3). Letras iguais indicam valores iguais; letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

5. Discussão

5.1. Níveis de 8-oxodGuo, MDA e etenoadutos nos tecidos dos mexilhões transferidos de um local limpo para poluído e níveis de 8-oxodGuo em mexilhões expostos a metais

Um dos objetivos deste trabalho era estudar comparativamente os níveis de lesões em DNA e membranas de diferentes tecidos de mexilhões de local limpo em relação à mexilhões coletados em locais poluídos. Os maiores níveis de 8-oxodGuo observados nas glândulas digestivas e brânquias de animais coletados no local poluído após 12 meses de exposição (figura 4.1.), indicam que a poluição marinha pode ser responsável por um aumento nos níveis de lesões oxidativas no DNA destes organismos. Assim, a utilização de análises de 8-oxodGuo em *P. perna* mostrou-se adequada para indicar um estresse causado pela contaminação do ambiente marinho.

Da mesma forma, Canova *et al.* (1998) e Akcha *et al.* (2000) observaram maiores níveis de 8-oxodGuo nas brânquias ou glândulas digestivas de mexilhões expostos ao composto carcinogênico benzo[*a*]pireno. Malins & Haimanot (1990), Martsh *et al.* 1993, Malins *et al.* (1994), Payne *et al.* (1998), Rodríguez-Ariza *et al.* (1999), observaram elevados níveis de 8-oxodGuo em peixes expostos a diferentes compostos tóxicos ou quando coletados em áreas poluídas. Por sua vez, Mitchelmore *et al.* (1996) e Nishimoto *et al.* (1991) observaram níveis elevados de 8-oxodGuo em peixes expostos a compostos nitroaromáticos.

Análises de metais pesados foram feitas pelo laboratório de química analítica da UFSC durante o período de implementação do experimento de transplante dos mexilhões do local limpo para o poluído, as quais acusaram uma presença elevada de alguns metais como níquel, manganês, cobre e cádmio na água do local poluído, em relação ao local referência (tabela 10.1., nos anexos). Elevados níveis de metais no ambiente marinho tem sido relacionados com um aumento de lesões oxidativas ao DNA de organismos marinhos (Rodríguez-Ariza *et al.*, 1999; Torres *et al.* 2002). Como mostrado 4.15., mexilhões expostos a cádmio e chumbo por

24 horas apresentaram maiores níveis de 8-oxodGuo que animais controle, o que está de acordo com esta idéia. Assim, pode-se inferir que os maiores níveis de 8-oxodGuo encontrados nos animais do local poluído estejam relacionados aos maiores níveis de metais observados neste local de coleta.

Como mostrado ainda na figura 4.1., não houve diferença estatística entre os níveis de 8-oxodGuo no tecido do manto de animais referência e poluído, após 12 meses de exposição. Por outro lado, como indicado nas figuras 4.2. e 4.3., não houveram diferenças estatísticas entre os níveis de peroxidação lipídica assim como de etenoadutos tanto na glândula digestiva como nas brânquias, entre mexilhões dos locais poluído e referência. No entanto foi observado um aumento significativo nestes dois parâmetros nos tecidos do manto de animais do local poluído, em relação aos mexilhões do local referência.

É interessante notar que os maiores níveis de etenoadutos acompanharam os maiores níveis de peroxidação lipídica no tecido do manto. Este fato que pode indicar uma interdependência entre os níveis de peroxidação lipídica e de etenoadutos nos mexilhões, uma vez que propõe-se que etenoadutos são formados pela reação de produtos da peroxidação lipídica com as bases do DNA.

As diferentes respostas observadas entre os diferentes tecidos (maiores níveis de 8-oxodGuo nas brânquias e glândulas digestivas e maiores níveis de peroxidação lipídica e etenoadutos no manto), podem estar relacionadas a diferenças estruturais entre os tecidos. Já foi demonstrado que o tecido do manto e glândulas digestivas de moluscos bivalves possuem concentrações cerca de 3 a 6 vezes mais elevadas de ácidos graxos insaturados do que as concentrações encontradas nas brânquias. Por sua vez, as glândulas digestivas possuem um maior conteúdo de antioxidantes lipofílicos do que o tecido do manto (RIBERA *et al.*, 1991; LEMAIRE & LIVINGSTONE, 1993), o que poderia explicar o fato de somente os tecidos do

manto de mexilhões do local poluído terem apresentado maiores níveis de peroxidação lipídica, e conseqüentemente maiores níveis de etenoadutos. O maior conteúdo de antioxidantes lipofílicos presentes na glândula digestiva poderia estar atuando de forma a não serem observados níveis aumentados de produtos da peroxidação lipídica neste tecido.

5.2. Análises de 8-oxodGuo em *M. guyanensis* e de MDA em *P. perna*, coletados em locais com suspeita de contaminação

Uma vez que as análises de 8-oxodGuo, peroxidação de lipídeos e de etenoadutos mostraram-se adequados para expressar uma situação de estresse em moluscos bivalves em função da contaminação do ambiente marinho, alguns destes parâmetros foram utilizados em estudos de monitoramento ambiental.

Da mesma forma que mexilhões *P. perna* transplantados de um local limpo para poluído apresentaram maiores níveis de 8-oxodGuo, os mexilhões *M. guyanensis* coletados em manguezais supostamente contaminados também apresentaram níveis significativamente mais elevados desta lesão em suas glândulas digestivas (figura 4.8.). Estes dados complementaram os resultados obtidos pelo grupo do prof. Wilhelm-Filho, onde foi verificado que os mesmos mexilhões de local poluído apresentaram maiores níveis de peroxidação lipídica, maiores atividades das enzimas CAT, GPx, glutathione redutase, GST, etóxioresorufina-*O*-deetilase, maiores conteúdos de glutathione oxidada, glutathione total e menor conteúdo de GSH. Todas estas alterações apresentaram correlações com níveis aumentados de metais pesados encontrados no ambiente (dados não mostrados; ver referência TORRES *et al.*, 2002, em anexo).

É importante realçar que, os níveis de 8-oxodGuo encontrados nos mexilhões *P. perna* e *M. guyanensis* foram maiores do que os níveis comumente encontrados em mamíferos, como

já observado anteriormente (MITCHELMORE *et al.*, 1996). Da mesma forma, Mallins & Haimanot (1990), Marsh *et al.* (1993), Canova *et al.* (1998) e Rodríguez-Ariza *et al.* (1999) também observaram maiores níveis de 8-oxodGuo em mexilhões (variando de 70 a 250 resíduos de 8-oxodGuo/ 10^6 dGuo) e peixes (variando de 30 a 300 resíduos de 8-oxodGuo/ 10^6 dGuo), em relação aos observados em mamíferos (0,8 a 12 resíduos de 8-oxodGuo/ 10^6 dGuo, de acordo com MATOS *et al.*, 2001 e CADET *et al.*, 2002). Estas diferenças poderiam estar relacionadas à produção artefactual de 8-oxodGuo durante os processos de extração e hidrólise de DNA, devido a diferentes metodologias aplicadas. Entretanto, neste trabalho isto não pode ser considerado porque estes procedimentos foram os mesmos utilizados por Matos *et al.* (2001), que observou níveis de 8-oxodGuo abaixo de 10 resíduos para cada 10^6 resíduos de dGuo em ratos, mesmo quando tratados com ferro.

Em outro estudo de monitoramento, foram feitas análises dos níveis de peroxidação lipídica em brânquias de mexilhões *P. perna* coletados em diferentes pontos do Canal de São Sebastião (SP). Comparando nossos dados com os dados obtidos pelo grupo da professora Sousa, pudemos constatar que os maiores níveis de peroxidação lipídica encontrados nos animais do local 4 em relação ao grupo controle 6 (figura 4.7.) estão de acordo com os menores tempos de retenção do vermelho neutro observados nos hemócitos dos mexilhões do local 4 (dados não mostrados). O teste do vermelho neutro (*neutral red assay*) é amplamente utilizado para indicar a integridade de lisossomos celulares. Aquelas células com membranas lisossomais mais íntegras tem a capacidade de reter por mais tempo o composto vermelho com o qual são pré-incubadas. Membranas de lisossomos deficientes (células com maiores níveis de peroxidação lipídica por exemplo) retém o vermelho neutro por menos tempo (DAILIANIS *et al.*, 2003). Assim, os maiores níveis de peroxidação lipídica observados nos mexilhões do

local 4 estão de acordo com as menores estabilidades de lisossomos observadas pelo teste do vermelho neutro.

5.3. Efeito do ciclo reprodutivo e dos ciclos de maré níveis de 8-oxodGuo e MDA em *P. perna*

Todos os resultados discutidos até agora indicaram que as análises feitas de danos em DNA e membranas mostraram-se adequadas para expressar o grau de contaminação do ambiente marinho. Entretanto, apesar da confirmação de que a contaminação marinha possa ocasionar um aumento nos níveis de 8-oxodGuo, MDA e etenoadutos em bivalves, neste trabalho também pudemos observar que outros fatores ambientais não relacionados à poluição, podem também ocasionar variações nestes parâmetros. Tais fatores poderiam ser responsáveis por resultados artefatuais em estudos de biomonitoramento ambiental, muitas vezes gerando interpretações e atribuições errôneas dos resultados obtidos aos efeitos dos contaminantes nos organismos.

Assim, pudemos constatar que mexilhões *P. perna* coletados no outono apresentaram maiores níveis de 8-oxodGuo e MDA na glândula digestiva e tecido do manto, em relação aos mexilhões coletados no verão (figura 4.4.). Este resultado está provavelmente associado aos ciclos reprodutivos desta espécie, uma vez que em *P. perna* observa-se uma maior atividade reprodutiva no outono em relação às outras estações do ano (MAGALHÃES, 1998). Por outro lado, mexilhões coletados no verão apresentaram maiores níveis de 8-oxodGuo na glândula digestiva, o que por sua vez poderia estar relacionado a outros fatores ambientais não estudados neste trabalho, tais como a temperatura da água. Já foi demonstrado, por exemplo, acréscimos na atividade de enzimas antioxidantes em virtude de acréscimos na temperatura da água (VIARENGO *et al.*, 1991; SOLÉ *et al.*, 1995; CANCIO *et al.*, 1995; WILHELM-

FILHO, 2001). Em relação aos níveis de MDA, é importante ressaltar que as diferentes metodologias aplicadas entre as duas estações poderia ter contribuído para as diferenças observadas.

Um outro fator de estresse ambiental que pode ocasionar mudanças no metabolismo de bivalves são os ciclos de exposição ao ar e re-submerção aos quais animais de costão estão diariamente sujeitos. Assim, comparando-se as análises de 8-oxodGuo feitas nos mexilhões coletados em um costão rochoso na praia da Joaquina em Florianópolis, SC (figura 4.5.) com os dados obtidos das análises do experimento de transplante de mexilhões de local referência para poluído, constatamos que mexilhões de populações naturais apresentaram níveis muito maiores de 8-oxodGuo na glândula digestiva, ou seja, estes dados indicaram que outros fatores ambientais poderiam contribuir para um elevado nível de lesões oxidativas no DNA desta espécie, uma vez que a praia da Joaquina não é tipicamente um foco de contaminação ambiental.

Algumas hipóteses podem ser especuladas para se explicar este fato. Como dito na introdução, os mexilhões são organismos sésseis e por isso apresentam uma série de variações circadianas e sazonais influenciadas por flutuações nos parâmetros ambientais, tais como amplitude de maré, ação de ondas, temperatura, salinidade, níveis de oxigênio dissolvido e disponibilidade de alimento (AKBERALI & TRUEMAN, 1985).

Assim, os animais de costão possuem uma fonte a mais de estresse que os mexilhões do experimento de transferência dos mexilhões de local limpo para poluído, os quais permaneceram todo o período do experimento submersos na água.

Outra possibilidade ainda, é a produção de espécies reativas tais como $^1\text{O}_2$, via mecanismos de fotosensibilização, quando os mexilhões estão expostos ao ar e, conseqüentemente, à luz solar. Apesar de manterem suas valvas fechadas, quando expostos ao

ar os mexilhões realizam movimentos periódicos de abrir e fechar as valvas com o objetivo de formar bolhas de ar na água que fica acumulada no seu interior. Desta forma eles conseguem captar oxigênio do ar, e manter uma baixa taxa de respiração, além de expelir metabólitos do seu metabolismo anaeróbico (AKBERALI & TRUEMAN, 1985; MARSDEN & WEATHERHEAD, 1998).

Em consequência disso, este processo permite a entrada da luz solar, que pode estar envolvida na produção de espécies reativas por processos de fotosensibilização. Com base nesta idéia, já foi demonstrado que mexilhões de populações mais próximas à superfície num costão rochoso, apresentam maiores danos ao DNA (quebras de fita simples), provavelmente associados a um maior estresse ocasionado pelo batimento de ondas, oscilações de maré e a uma maior produção de $^1\text{O}_2$ por processos de fotosensibilização dos pigmentos do manto (STEINERT *et al.*, 1998).

Para verificar o efeito dos ciclos de exposição ao ar e re-submersão na produção de 8-oxodGuo e peroxidação lipídica, um experimento foi feito onde um grupo de mexilhões foi exposto ao ar por 24 horas, outro foi exposto ao ar por 24 horas seguido de re-submersão em água do mar por 3 horas e outro grupo permaneceu todo o período imerso na água do mar. Tais dados são de fundamental importância para o estabelecimento de protocolos de coleta de mexilhões em programas de biomonitoramento ambiental, uma vez que elevados níveis de lesões oxidativas poderiam ser observadas quando os animais são expostos a contaminantes (como no caso dos mexilhões expostos a chumbo e cádmio por 24 horas ou coletados no local poluído) tanto quanto devido ao estresse ocasionado por fatores abióticos ambientais, tais como os ciclos de maré.

Na figura 4.6. foram apresentados os dados referentes às análises de MDA e 8-oxodGuo em glândulas digestivas e brânquias de animais deste experimento. Animais

expostos ao ar apresentaram níveis significativamente maiores de MDA na glândula digestiva e brânquia, e de 8-oxodGuo na brânquia, em relação ao grupo controle, assim como nenhuma diferença após 3 horas de re-submersão em relação ao grupo controle.

A interpretação destes resultados poderia ser baseada na teoria proposta por Hermes-Lima & Storey (1995), de que animais submetidos a constantes variações de oxigênio poderiam ter desenvolvido ao longo da evolução uma resposta adaptativa que amenizasse os efeitos do estresse oxidativo sob estas condições de hipóxia/hiperóxia.

Em trabalhos anteriores, verifiquei que mexilhões *P. perna* expostos ao ar por 18 horas e expostos ao ar por este período seguidos de re-submersão, não apresentaram diferenças na atividade das enzimas antioxidantes e complementares SOD, GPx, CAT, glutathione redutase, glicose-6-fosfato desidrogenase e glutathione total, em relação aos grupos controles, ao contrário do que acontece em muitos modelos com mamíferos (ver tabela 10.2. em anexo). Estes dados indicam que mesmo sob condições de hipóxia (exposição ao ar) quanto de hiperóxia (re-submersão), os mexilhões são capazes de manter a atividade de sistemas antioxidantes em níveis normais, ao contrário do que comumente ocorre em mamíferos (ALMEIDA *et al.*, 1998). Entretanto, os mecanismos que modulam estes sistemas sob estas condições, permanecem obscuros.

Como dito anteriormente, quando expostos ao ar, os mexilhões conseguem manter a respiração através de movimentos de abrir e fechar de suas valvas (comportamento denominado *gapping*), produzindo bolhas de ar na superfície da água contida dentro da concha (AKBERALI & TRUEMAN, 1982). Marsden *et al.* (1998), mediram o consumo de oxigênio do mexilhão *Mytilus edulis* durante um período de exposição ao ar e verificaram que este mexilhão consegue manter seu metabolismo aeróbico durante prolongados períodos de exposição ao ar, ainda que este metabolismo seja baixo.

Desta forma, mesmo quando são expostos ao ar, há um leve fluxo de oxigênio nos tecidos dos mexilhões, o qual poderia estar envolvido na produção de EROs e consequentemente de lesões oxidativas. Pode-se especular que nestas condições, os mecanismos preventivos contra lesões em DNA (enzimas de reparo, por exemplo) e a membranas (enzimas PHGPx e fosfolipases, por exemplo) não sejam tão eficientes quanto em uma situação de normóxia, o que justificaria os maiores níveis de MDA e 8-oxodGuo observados. Entretanto, estas hipóteses permanecem por serem validadas.

Quando os animais são re-oxigenados, os similares níveis de enzimas antioxidantes em relação a mexilhões submersos em água do mar observados anteriormente, poderiam justificar o decréscimo observado nos níveis de lesões.

Resumindo, pode-se sugerir que quando os mexilhões são expostos ao ar, um baixo fluxo de oxigênio nos tecidos aliado a um possível decréscimo na eficiência dos sistemas de defesa e/ou reparo, poderia aumentar a susceptibilidade dos tecidos à lesões oxidativas. Quando re-submersos em água do mar, a atividade de enzimas antioxidantes mantida sob níveis basais poderia amenizar os efeitos causados por um possível aumento na produção de EROs/ERNs.

5.4. Efeito da salinidade e exposição à óleo diesel nos níveis de peroxidação lipídica em *C. rhizophorae*

Como descrito na introdução deste trabalho, variações nos níveis de salinidade podem também causar modificações no metabolismo de moluscos bivalves. Com o intuito de verificar esta hipótese, um experimento de exposição de mexilhões a diferentes salinidades e concentrações de óleo diesel foi feito. Na tabela 4.1. foram apresentados os dados de MDA em brânquias de ostras do mangue *C. rhizophorae* utilizadas neste experimento.

Como mostrado na tabela 4.1., sob concentrações de 0,01 e 0,1 % de óleo diesel nas salinidades 9 e 15 ‰, e concentrações de óleo diesel de 0,001, 0,01 e 0,1 % de óleo diesel na salinidade 35 ‰, os mexilhões apresentaram níveis significativamente maiores de peroxidação lipídica em relação aos grupos controle. Na salinidade de 25 ‰, nenhuma diferença foi observada nos níveis de peroxidação lipídica, o que pode estar relacionado a um melhor sistema antioxidante destes organismos nesta salinidade, considerada ótima para esta espécie (CASTRO *et al.*, 1985).

De acordo com os sistemas analisados pelo grupo do professor Bainy, nenhuma diferença foi observada na atividade das enzimas CAT e Ache, entre os animais expostos às diferentes concentrações de óleo diesel e salinidades, e animais controle. Entretanto, animais expostos ao óleo diesel na salinidade de 25 ‰, apresentaram maior atividade da GST em relação ao grupo controle, sendo que nas outras salinidades não foram observadas diferenças na atividade desta enzima (dados não mostrados). De certa forma, estes dados evidenciam que há um aumento na atividade de sistemas de detoxificação de xenobióticos das ostras quando expostas ao óleo diesel na salinidade de 25 ‰, o que poderia indicar sistemas mais eficientes de proteção contra a peroxidação lipídica sob esta salinidade.

Quando submetidos à depuração, nenhuma diferença foi observada nos níveis de MDA após 1 e 7 dias, sugerindo que este organismo possui alta eficiência no reparo das lesões nos tecidos após uma exposição aguda ao óleo diesel. Da mesma forma, nenhuma diferença foi observada nas atividades da CAT e Ache após os períodos de depuração. Por outro lado, a atividade da GST mostrou-se elevada após 1 e 7 dias de depuração na salinidade de 25 ‰, e após 1 dia de depuração na salinidade 15 ‰.

5.5. Efeito dos metais na atividade da AChE em *P. perna*

Diversos compostos, principalmente inseticidas do tipo carbamatos e compostos organofosforados, tem sido mostrado causar uma inibição da enzima AChE. Mas além destes, recentemente outros compostos têm sido descritos na literatura como causadores da inibição da AChE, como por exemplo detergentes e alguns metais pesados (GUILHERMINO *et al.*, 2000; CAJARAVILLE, 2000; SAINT-DENIS *et al.*, 2001).

Contudo, Guill *et al.* (1991) observaram que ao invés de uma inibição, peixes expostos a cádmio tiveram um aumento significativo da atividade da AChE. Como mostrado nos resultados, os mexilhões expostos a cádmio apresentaram um aumento bastante acentuado da atividade da AChE após três dias de exposição (figura 4.9.), estando de acordo com os dados obtidos por Guill *et al.* (1991).

Além disso, foi verificado que os mexilhões expostos a chumbo tiveram também uma atividade significativamente maior após 12 horas de exposição a chumbo. Estes dados estão parcialmente de acordo com Saint-Denis *et al.* (2001), que observou um decaimento na atividade da AChE de lagartas da terra expostas a chumbo por 14 dias e um aumento na atividade desta enzima após 28 dias de exposição. Segundo estes autores, os metais podem diminuir a eficiência de ligação da AChE ao seu substrato, o que decorreria em uma maior produção da enzima pelo organismo em um primeiro momento, de forma a hidrolisar acetilcolina mais eficientemente. Em exposições crônicas esta estratégia poderia não ser eficiente de modo a ocorrer um declínio na atividade da AChE.

5.6. Efeito dos metais nas atividades da CAT, GPx, GST e PHGPx, e nos níveis de GSH e MDA em *P. perna*

A exposição de organismos marinhos a cádmio tem sido relacionada com um aumento na susceptibilidade dos tecidos à peroxidação lipídica. Desta forma, Prakash & Rao (1995) observaram aumentados níveis de peroxidação lipídica em bivalves *Perna viridis* expostos a cádmio por 1 e 7 dias, e Geret *et al.* (2002) observaram que, apesar de o cádmio não afetar a atividade de enzimas antioxidantes, este metal causou um aumento significativo nos níveis de MDA após 14 dias de exposição. Como mostrado na figura 4.11, apenas mexilhões expostos a cádmio por 12 h apresentaram níveis significativamente maiores de MDA em relação ao grupo controle, o que aparentemente poderia estar relacionado a um decréscimo na atividade da GPx e dos níveis de GSH. A enzima GPx e o tripeptídeo GSH são componentes antioxidantes importantes nas células, estando envolvidos na proteção contra danos a componentes celulares mediados por EROs/ERNs. Assim, a inibição ou depleção destes componentes devido a exposição ao cádmio poderia aumentar a susceptibilidade do tecido a um aumento nos níveis de peroxidação lipídica. Porém, também foram observados níveis significativamente menores na atividade da GPx após 24 e 72 h de exposição, sem que tenham sido observadas diferenças nos níveis de MDA após estes períodos de exposição.

Correlações interessantes foram observadas quanto os níveis de MDA e a atividade da PHGPx. Como mostrado na figura 4.11., 12 h de exposição à cádmio não causou nenhum efeito na atividade da PHGPx, mas houve um nível significativamente maior de MDA. Por outro lado, a exposição ao cádmio por 24 e 120 h estimulou a atividade da PHGPx, a qual apresentou-se significativamente maior do que os grupos controles, sendo que não foram observadas diferenças nos níveis de MDA.

A enzima PHGPx possui uma reatividade específica contra os hidroperóxidos de fosfolipídeos formados durante a cadeia de reações da peroxidação lipídica. Assim, uma atividade aumentada desta enzima após 24 e 120 h de exposição ao cádmio pode ser responsável por não haverem maiores níveis de MDA nos mexilhões expostos a este metal nestes períodos. Desta maneira, o fato de que nenhuma diferença tenha sido observada nos níveis de MDA nos mesmos períodos em que a PHGPx foi estimulada, sugere um papel protetor desta enzima contra a peroxidação lipídica em mexilhões. Após 120 horas de exposição ao cádmio, a elevada atividade da CAT também poderia contribuir de forma a prevenir a peroxidação lipídica. De acordo com esta idéia, Viarengo *et al.* (1999) observaram maiores níveis da enzima CAT em mexilhões da espécie *Mytilus edulis* expostos a cádmio por 7 dias, sem que diferenças nos níveis de MDA fossem observadas.

Resultados similares foram observados nos mexilhões expostos a cobre (figura 4.10.), onde os níveis de MDA foram significativamente maiores após 120 horas, correspondendo aos menores valores observados para a PHGPx. A exposição de mexilhões ao cobre causou uma moderada ($p = 0,053$) e uma forte depleção nos níveis de GSH após 24 e 72 horas, respectivamente. Apesar de não terem sido observadas diferenças nas atividades da GPx e da PHGPx, pode-se especular que suas eficiências estivessem diminuídas após estes períodos de exposição, uma vez que estas enzimas utilizam GSH na redução dos peróxidos. Assim, provavelmente estes fatores tenham contribuído para os níveis aumentados de MDA após 120 h de exposição ao cobre. A depleção nos níveis de GSH pode ser devida as atividades das enzimas PHGPx e GPx ou, mais provavelmente, devido a detoxificação do cobre, uma vez que existem diversas evidências de que GSH seja um dos quelantes intracelulares de cobre (FREEDMAN *et al.*, 1989). Similarmente, Doyotte *et al.* (1997) observaram que a exposição de bivalves de água doce da espécie *Unio tumidus* a cobre por 72 horas causou depleção de

GSH. Canesi *et al.* (1998), também observaram menores níveis de GSH em mexilhões *Mytilus galloprovincialis* expostos a cobre por 72 horas.

Nenhuma diferença foi observada na atividade das enzimas GPx e GST durante a exposição ao cobre e ao ferro (figuras 4.11 e 4.12., respectivamente). Com base nestes resultados pode-se sugerir que o cobre e o ferro, nas concentrações utilizadas neste trabalho, não exercem efeitos nas atividades destas enzimas. Doyotte *et al.* (1997) observaram que mexilhões *U. tumidus* expostos por 72 h a 30 µg de cobre não apresentaram diferenças na atividade da GPx.

Na verdade, em relação à enzima GST, não foram observadas diferenças estatísticas entre os diferentes grupos de mexilhões expostos a todos os tratamentos. Estes dados podem indicar que as concentrações de metais utilizadas no experimento não seriam suficientemente altas de forma a alterar o metabolismo desta enzima nos mexilhões.

Também, mexilhões expostos a todos os metais por 120 h apresentaram um aumento significativo na atividade da CAT, o que poderia ser indicativo de uma alta produção de H₂O₂ em resposta aos metais. Entretanto, estas diferenças podem ser também relacionadas a um decréscimo na atividade da CAT no grupo controle, nas coletas após 120 horas de exposição aos metais, causado por algum outro fator ambiental não controlado tal como a temperatura da água.

Mexilhões expostos a ferro por 12, 24, e 72 h apresentaram uma maior atividade da PHGPx, e nenhuma diferença nos níveis de MDA (figura 4.12.), o que pode ser relacionado a um papel protetor da PHGPx contra a peroxidação lipídica. Quando expostos ao ferro por 120 h, tanto os níveis de MDA quanto a atividade da PHGPx mostraram-se significativamente mais elevados em relação ao controle. Tal aumento nos níveis de MDA está de acordo com os

resultados descritos por Viarengo et al. (1999). O fato de que a PHGPx foi mais alta que o controle após todos os períodos de exposição ao ferro pode indicar que este metal causa um efeito mais acentuado na modulação desta enzima do que os outros metais. De fato, como dito anteriormente, metais de transição tais como o ferro e o cobre podem estar envolvidos em reações de Fenton, gerando EROs. Entretanto, mesmo uma atividade mais elevada desta enzima em todos os períodos de exposição não foi suficientemente eficiente de forma a prevenir a peroxidação lipídica após 120 horas de exposição.

A exposição dos mexilhões ao chumbo (figura 4.13.) causou a depleção do GSH após 12 h, e causou um aumento na atividade da GPx após 120 h. De acordo com Alcutt & Pinto (1994), GSH pode proteger as células do acúmulo de chumbo através da formação de adutos insolúveis com o chumbo, os quais são excretados. Tal resposta pode ser a responsável pela depleção de GSH observada, o que poderia aumentar a susceptibilidade ao estresse oxidativo. Além disso, a maior atividade da GPx observada após 120 h de exposição a este metal poderia ter relação com uma aumentada produção de EROs, apesar de não terem sido observadas diferenças nos níveis de MDA, o que por sua vez pode também ser devido as altas atividades da PHGPx observadas após 12, 24 e 120 horas de exposição.

Fazendo-se as devidas correlações entre a atividade da PHGPx e os níveis de peroxidação lipídica, pudemos constatar correlações negativas significativas para os animais expostos a cobre e ferro (figura 4.15.), ou seja, quanto maior foi a atividade da PHGPx, menor foi a taxa de peroxidação lipídica e vice-versa. Estes dados ajudam a comprovar o papel protetor da PHGPx contra a peroxidação lipídica nos mexilhões.

5.7. Efeito dos metais nos níveis de 5HT e DOPA em *P. perna*

Na figura 4.16., foram apresentados os voltamogramas obtidos da injeção de 5 pmol de 5HT e de DOPA, variando-se os potenciais de 0,4 a 0,9 volts. Como podemos observar, o potencial de 0,7 volts foi o que apresentou os melhores sinais tanto para 5HT quanto para DOPA, sendo por isso o potencial utilizado no detector eletroquímico.

Na figura 4.17 foram apresentados os níveis de 5HT e DOPA nos músculos dos mexilhões expostos aos diferentes metais. Analisando-se o grupo controle separadamente, podemos observar uma pequena variação nos níveis de 5HT ao longo do tempo, o que sugere sua atividade no controle de ritmos biológicos.

Comparando-se os diferentes grupos, ao longo do tempo, podemos observar que após 24 horas de exposição a chumbo, cádmio e ferro e 72 horas de exposição a chumbo e cádmio, os níveis de 5HT foram menores que o grupo controle. Levando-se em consideração os diversos dados na literatura que indicam o efeito da 5HT no relaxamento da contração tônica de músculos adutores de mexilhões, e que a primeira resposta do mexilhão frente a exposição a xenobióticos é a contração tônica do músculo adutor fechando as valvas, podemos inferir que os mexilhões controle apresentaram uma maior predisposição ao relaxamento dos músculos do que os mexilhões expostos aos metais, apresentando assim níveis mais elevados de 5HT que os músculos dos mexilhões expostos aos metais. Em outras palavras, os maiores níveis de 5HT observados no grupo controle poderiam estar associado a um maior relaxamento muscular que os mexilhões expostos aos metais.

Por outro lado, mexilhões expostos a ferro por 12 horas apresentaram níveis significativamente maiores de 5HT em relação ao grupo controle, o que poderia indicar a liberação de 5HT induzida pela exposição ao ferro.

Existem dados controversos na literatura quanto ao papel da DOPA no tecido muscular de mexilhões. Gies (1986) observou que a DOPA exerceu o relaxamento do músculo retrator do bisso do mexilhão *Mytilus edulis*, em doses similares à 5HT, sendo responsáveis pela ativação da enzima adenilato ciclase, aumentando assim os níveis de AMP cíclico causando o relaxamento das fibras musculares. Resultados similares foram observados por Kohler & Lindl (1980), porém estes observaram que precisaria uma concentração muito maior de DOPA, para ocasionar o mesmo relaxamento causado pela 5HT no mexilhão *Mytilus edulis*. Por outro lado, Salánki *et al.* (1974) e Nemcsók *et al.* (1997), observaram que a DOPA exerce a contração tônica do músculo adutor do mexilhão de água doce *Anodonta cygnea*. Todavia, sabe-se que a DOPA é um importante neuromodulador muscular em moluscos bivalves, assim como a 5HT, acetilcolina e noradrenalina.

Existem alguns trabalhos na literatura descrevendo o efeito da exposição de organismos a metais pesados sobre os níveis de DOPA. Recentemente, Gedeon *et al.* (2001) descreveram o efeito da exposição à chumbo nos níveis de DOPA em sistema nervoso de ratos, verificando um grande aumento (230 %) dos níveis de DOPA após 60 dias de exposição, sendo que estes níveis decaíram bruscamente, ao longo de mais 120 dias de exposição. Rademacher *et al.* (2001) observou que os níveis de DOPA em medula, nervo ótico e cerebelo de trutas (*Onchorhynchus mykiss*) expostas a chumbo por duas semanas foi significativamente menor que o grupo controle, em todos os tecidos estudados.

Observando a figura 4.17., podemos verificar um efeito semelhante nos músculos dos mexilhões expostos a chumbo. Após 12 horas de exposição, os níveis de DOPA foram significativamente maiores que os do grupo controle. Porém, estes níveis decaíram após 24, 72 e 120 horas de exposição.

Semelhantemente, Alcaraz-Zubeldia *et al.* (2001), relataram que a exposição de ratos a cobre causa a depleção dos níveis de DOPA, sendo que o mesmo foi observado nos mexilhões expostos a cobre. Primeiramente, após 12 horas de exposição a este metal, os níveis de DOPA aumentaram significativamente, decaindo após 120 horas de exposição, em relação ao grupo controle.

Interessante notar que após 12 horas, os níveis de DOPA foram também significativamente maiores em mexilhões expostos a ferro e cádmio. Após 24 horas de exposição ao ferro, os níveis decaíram significativamente mas foram similares ao controle após 72 e 120 horas. Estes dados, evidenciam que os metais pesados podem causar bruscas oscilações nos níveis de DOPA em mexilhões.

Resultados similares foram encontrados para os níveis de 5HT e DOPA nas glândulas digestivas, como mostrado na figura 4.18. Os níveis de DOPA foram significativamente maiores após 12 horas de exposição dos mexilhões a chumbo, cobre e ferro. Por outro lado, após 120 horas de exposição a chumbo, os mexilhões apresentaram níveis menores de DOPA em relação ao grupo controle.

Com relação aos níveis de 5HT na glândula digestiva, os mexilhões expostos a cádmio e ferro apresentaram um incremento significativo após 24 horas de exposição. Entretanto após 72 horas de exposição a chumbo, cobre, cádmio e ferro, assim como 120 horas de exposição a chumbo e ferro, os níveis de 5HT foram significativamente menores em relação ao grupo controle. Estes dados ajudam a corroborar a hipótese de que a contaminação ambiental por metais pesados pode afetar os níveis de 5HT e DOPA em diferentes tecidos de moluscos bivalves.

Trabalhos recentes indicam que DOPA e 5HT são neuromoduladores fundamentais no controle da alimentação de moluscos (KEMENES, 1997). A presença de DOPA no sistema

digestivo de moluscos é responsável pelas respostas dos moluscos ao alimento, enquanto que 5HT possui uma atividade predominantemente modulatória no comportamento alimentar. Kemenes *et al.* (1990) tratou espécies de gastrópodes com as neurotoxinas 6-hidróxidopamina e 5,6-dihidróxitriptamina, causando a inibição das respostas aos neuro-hormônios DOPA e 5HT, respectivamente. Quando tratados com 6-hidróxidopamina por 24 e 72 horas os animais não responderam ao alimento, enquanto que quando tratados com 5,6-dihidróxitriptamina não responderam após 12 a 18 dias.

Sendo assim, alterações nos níveis de 5HT e DOPA nos mexilhões causadas por metais, poderiam causar sérias mudanças comportamentais nestes organismos, comprometendo por exemplo o comportamento alimentar. Como dito anteriormente, a primeira resposta de mexilhões a qualquer tipo de estresse, é a contração tônica dos músculos adutores fechando as valvas e isolando os tecidos internos do animal do ambiente externo. Sabe-se que em tais condições os animais ficam incapacitados de se alimentarem devido ao interrompimento do fluxo de água do ambiente para o animal, que traria as partículas de alimento (matéria orgânica particulada, micro algas e/ou micro crustáceos). Isto, aliado a uma possível inibição do comportamento alimentar dos mexilhões pelos metais pesados poderia aumentar ainda mais os níveis de estresse fisiológico dos animais.

5.8. Influência do horário de coleta e dos ciclos de exposição ao ar e re-submersão nos níveis de 5HT e DOPA em *P. perna*

Na figura 4.19. temos os perfis dos níveis de 5HT e DOPA em glândulas digestivas e músculos, de mexilhões coletados em diferentes períodos de claro e escuro de um mesmo dia. Como pode-se notar, nenhuma diferença foi observada nos níveis de DOPA e 5HT em GD e no músculo, respectivamente, nos diferentes períodos do dia. Entretanto mexilhões coletados

às 4:00 horas apresentaram níveis de 5HT significativamente maiores na glândula digestiva, em relação aos outros grupos, assim como níveis significativamente maiores de DOPA no tecido muscular, em relação ao grupo coletado às 16:00 horas. Tais dados evidenciam que mudanças nos níveis destes compostos nos mexilhões podem ocorrer em função dos ritmos biológicos diários dos animais. Além disso, comparando-se os níveis de DOPA e 5HT nos diferentes tecidos, pudemos constatar que os níveis de ambos os dois compostos são cerca de 10 a 20 vezes mais altos no músculo que nas glândulas digestivas, evidenciando um papel principal destes compostos no relaxamento muscular.

Mexilhões expostos ao ar por 24 horas apresentaram níveis significativamente menores de DOPA e 5HT no músculo, e nenhuma diferença nas glândulas digestivas (figura 4.20). Tal resultado está provavelmente associado a uma contração dos músculos durante o período de exposição, mantendo água dentro das conchas, evitando assim a dessecação.

Após 24 horas de exposição ao ar seguido de re-submersão na água por mais 3 horas, os mexilhões apresentaram níveis de 5HT similares aos do controle. Com a re-submersão, espera-se que o mexilhão relaxe a musculatura de forma a abrir as valvas retornando a respirar e se alimentar. Desta forma, os resultados apresentados estão de acordo com o esperado, exceto que os níveis de DOPA permaneceram baixos após três horas de re-submersão, fato que pode estar relacionado a uma atividade secundária da DOPA no controle do relaxamento muscular, sendo a 5HT o principal neuromodulador envolvido neste processo, como de fato descrito na literatura (KOHLER & LINDL, 1980).

6. Conclusões

Neste trabalho, alterações em alguns sistemas bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo foram avaliados em diferentes espécies de moluscos bivalves, com o intuito de se verificar a possibilidade de sua utilização como indicativos de ambientes potencialmente contaminados. Entretanto, sabe-se que fatores ambientais de estresse não relacionados à contaminação marinha podem influenciar nos parâmetros analisados. Portanto, alguns dos sistemas aqui analisados em resposta à contaminação ambiental, foram também avaliados em resposta a outros tipos de estresse ambiental, tais como variações de salinidade e disponibilidade de oxigênio. As principais conclusões retiradas destes experimentos foram:

Mexilhões coletados em local poluído, apresentaram maiores níveis de lesões oxidativas ao DNA e membranas bem como de etenoadutos de DNA do que mexilhões coletados em local referência, na coleta após 12 meses de exposição (verão). Estes dados indicam que a poluição pode ocasionar maiores níveis de lesões em mexilhões. Da mesma forma, verificamos que mexilhões expostos a metais apresentaram maiores níveis de 8-oxodGuo e MDA que animais controle.

Desta forma, alguns destes parâmetros foram analisados em tecidos de bivalves moluscos, em relação à possível presença de contaminantes em diferentes ambientes marinhos. Mexilhões de mangue da espécie *Mytella guyanensis* de local poluído apresentaram maiores níveis de 8-oxodGuo nas glândulas digestivas, em relação a grupos controle. Da mesma forma, mexilhões de um dos pontos do Canal de São Sebastião (ponto 4) apresentaram maiores níveis de peroxidação lipídica em relação ao grupo escolhido como referência, sugerindo uma possível maior contaminação no ponto 4.

Apesar de a poluição afetar os parâmetros bioquímicos propostos neste trabalho, fatores ambientais não relacionados à poluição também ocasionaram mudanças nos níveis de 8-oxodGuo e MDA. Assim, mexilhões coletados no outono apresentaram níveis maiores de 8-oxodGuo, MDA e 1, N^2 - ϵ dGuo do que animais coletados no verão, o que poderia estar relacionados a uma maior atividade metabólica em função dos ciclos reprodutivos desta espécie.

Pudemos constatar também que mexilhões de costão apresentaram maiores níveis de 8-oxodGuo nas glândulas digestivas do que animais de cultivo, o que poderia estar associado ao fato destes animais estarem diariamente sujeitos às oscilações de maré, com conseqüentes variações na disponibilidade de oxigênio.

Ostras de mangue da espécie *C. rhizophorae* apresentaram também diferenciados níveis de peroxidação lipídica, em função da salinidade. Da mesma forma, a salinidade influenciou nos níveis de lipoperoxidação entre ostras expostas à diferentes concentrações de óleo diesel, indicando que a salinidade influencia também nas respostas destes organismos frente à exposição aos xenobióticos.

Estes dados indicam que deve-se ter especial atenção às condições de coletas entre diferentes pontos de coleta, em estudos onde se quer avaliar a contaminação por xenobióticos, utilizando mexilhões como organismos sentinela, de forma a não serem obtidos resultados artefatuais em função de variações abióticas não controladas.

A exposição de mexilhões a metais pode causar a depleção tanto de 5HT quanto de DOPA nas glândulas digestivas e em tecidos musculares. No caso específico de tecidos musculares, uma diminuição dos níveis destes dois compostos poderia ser devido à contração tônica das valvas dos mexilhões em resposta a presença dos metais, uma vez que estes dois

compostos estão envolvidos no relaxamento muscular dos mexilhões. Quando mexilhões foram expostos ao ar, constatamos também uma diminuição nos níveis de 5HT e DOPA no músculo, o que provavelmente estava associado à contração muscular para o fechamento das valvas, evitando assim a dessecação. Ao serem re-submersos, os níveis voltaram aos anteriores (similares aos controles), o que indicaria o relaxamento dos músculos com a conseqüente abertura das valvas. Nenhuma diferença foi observada nas glândulas digestivas.

Pequenas variações foram também observadas nos níveis de 5HT e DOPA, entre mexilhões coletados em diferentes horários do dia, indicando um possível papel destes dois compostos no controle dos ritmos biológicos. Sendo assim, oscilações nos níveis destes dois compostos em função da exposição a metais pesados podem comprometer também os ritmos biológicos destes animais.

No estudo com mexilhões expostos a metais, verificamos que a exposição destes a metais pode ocasionar mudanças na atividade de enzimas antioxidantes tais como a CAT, GPx, GST, PHGPx e AChE, bem como nos níveis de e GSH e MDA, com conseqüente aumento na susceptibilidade dos tecidos às lesões oxidativas. Correlações foram observadas entre a atividade da PHGPx e os níveis de MDA, sugerindo que esta enzima atua na proteção contra a peroxidação lipídica em *P. perna*, sendo possivelmente modulada pela presença de metais.

7. Adendos

7.1. Algumas considerações sobre a detecção da melatonina (MEL) nos mexilhões

Como dito na introdução deste trabalho, não existem relatos na literatura de detecção de MEL em moluscos bivalves, assim como também não existem evidências de que estes organismos não a produzam.

Neste trabalho, diferentes metodologias foram aplicadas no sentido de se tentar detectar níveis de MEL em tecidos do mexilhão *Perna perna*. A princípio, animais coletados tanto durante o dia quanto às três horas da manhã (levando-se em consideração que a produção de MEL é maior durante a noite na maioria dos organismos) tiveram diferentes tecidos dissecados e a MEL foi extraída utilizando diferentes métodos reportados na literatura. As alíquotas supostamente contendo MEL foram analisadas tanto por espectrometria de massas quanto por HPLC acoplado a detector eletroquímico, de acordo com Harumi & Matsushima (2000), Laganà *et al.* (1995) e Kolár *et al.* (1997), porém não foi detectada a presença deste composto nos diferentes extratos dos diferentes tecidos (dados não mostrados). Em outras tentativas, mexilhões inteiros coletados também em diferentes períodos do dia foram homogeneizados e processados de acordo com a literatura, para a obtenção da fração contendo MEL, porém não foi detectado MEL nestas amostras também.

Assim, apenas análises de 5HT e de DOPA foram feitas nos mexilhões, como apresentado anteriormente neste trabalho. Por este motivo, como alternativa, buscamos utilizar os padrões de MEL adquiridos para outros fins, que não a detecção em mexilhões.

Fazendo uma revisão bibliográfica na literatura, verificamos que existem diversos trabalhos referindo-se à MEL como um excelente antioxidante (REITER, 1998; REITER *et al.*, 2000; MARSHAL *et al.*, 1996). A MEL, por exemplo, diminuiu danos ao DNA de ratos tratados com compostos carcinogênicos (TAN *et al.*, 1993), limitou os danos causados

à pulmões de ratos tratados com paraquat (MELCHIORI *et al.*, 1995), diminuiu os níveis de peroxidação lipídica em fígado de ratos expostos a tetracloreto de carbono (DANIELS *et al.*, 1995) e suprimiu o desenvolvimento de catarata em ratos recém nascidos tratados com o agente depletor de glutathione sulfoximina butionina (ABE *et al.*, 1994).

Além disso, a reatividade química de EROs com a MEL já foi extensivamente estudada por ressonância paramagnética eletrônica (EPR), onde verificou-se que a MEL suprimiu os sinais dos radicais $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, 1O_2 , assim como diminuiu a toxicidade do H_2O_2 na presença de reagentes de Fenton (ZANG *et al.*, 1998; MATUSZAK *et al.*, 1997).

Da mesma forma, diversas EROs/ERNs podem reagir com a MEL gerando uma série de produtos já bem estabelecidos e caracterizados por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (RMN). Sabe-se por exemplo, que a reação de $\cdot OH$, NO e H_2O_2 com a MEL formam os produtos 3-hidróximelatonina, 3-nitrosomelatonina e *N*¹-acetil-*N*²-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK), respectivamente (TAN *et al.*, 1998; TURJÁNSKI *et al.*, 2000; TAN, *et al.*, 2000, figura 7.1.). Entretanto, o produto da reação de MEL com o 1O_2 ainda não havia sido descrito, apesar de certas evidências indicarem que o produto poderia ser também o AFMK (ANDRISANO *et al.*, 2000). Assim, neste trabalho foram feitos estudos de forma a se caracterizar o produto de oxidação da MEL pelo 1O_2 , utilizando como fontes de 1O_2 a fotossensibilização com azul de metileno e a termodecomposição de um endoperoxídeo derivado de naftaleno, como segue.

Figura 7.1. – Algumas das EROs/ERNs com as quais a MEL pode reagir formando produtos.

7.2. Fotooxidação da MEL e análises por espectrometria de massas

Neste estudo, a MEL foi dissolvida em 2 mL água (2mM) contendo 20 μL de uma solução de azul de metileno (6 mg/mL) e exposta à uma lâmpada de 500 W por 1 hora, borbulhando-se oxigênio. Aliquotas de 20 μL foram coletadas a cada 10 minutos e analisadas por HPLC e por espectrometria de massas, operando no módulo *electrospray ionization* positivo (HPLC/ESI/MS), em um espectrômetro Quattro II (Micromass, Altrincham, U.K.). O sistema de HPLC utilizado consistia de um detector de UV *photodiodearray* SPD-M10A VP (Shimadzu, Kyoto, Japão), monitorando as amostras entre

os comprimentos de onda de 200 a 370 nm, duas bombas modelo LC-10AD (Shimadzu, Kyoto, Japão), bombeando os solventes (gradiente de metanol de 20 a 40 % em água) e coluna analítica SUPELCOSIL LC18 (150 X 4,6 mm, 5µm, Supleco). Os cromatogramas foram adquiridos com o auxílio do *software* Class VP 5.032;

O espectrômetro de massas teve a voltagem do cone e temperatura da fonte ajustados para 15 V e 100°C, respectivamente. Após passarem por um sistema de HPLC equipado com um detector de UV SPD-M10A VP (Shimadzu, Kyoto, Japão) em 275 nm e duas bombas LC-10AD (Shimadzu, Kyoto, Japão), bombeando os solventes sob o mesmo gradiente descrito acima, as amostras entraram no espectrômetro através de um *splitter* ajustado para um fluxo de entrada da bomba para a coluna de 1 mL/min e saída para o espectrômetro de 0,25 mL/min.

7.3. Síntese do *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanoato (DHPN)

Apesar de se usar azul de metileno como fonte de $^1\text{O}_2$, muitos trabalhos indicam que este sistema pode gerar outras espécies reativas que, em determinados casos, poderiam causar interferência no estudo da reatividade do $^1\text{O}_2$ com compostos orgânicos. Inoue *et al.* (1982), por exemplo, observaram que a fotooxidação do triptofano em azul de metileno ou rosa bengala poderia ocorrer via mecanismo do tipo I (onde o próprio triptofano poderia ser fotosensibilizado) ou do tipo II (*via* $^1\text{O}_2$). Sendo assim, dúvidas poderiam surgir sobre a reatividade do $^1\text{O}_2$ com a MEL, em relação à contribuição de outras espécies reativas que poderiam ser formadas durante o processo de oxidação.

Diversas fontes químicas mais limpas de $^1\text{O}_2$ tem sido descritas na literatura, tais como a termodecomposição de endoperoxídeos de naftalenos substituídos (DI MASCIO &

SIES, 1989). Inoue et al. (1982), que verificou a interferência de outras espécies reativas formadas durante a fotossensibilização do triptofano, utilizou o endoperóxido do 3-(1,4-epidioóxi-4-metil-1,4-dihidro-1-naftil)-ácido propiônico, como fonte de $^1\text{O}_2$, através da sua termodecomposição em 37°C .

Por este motivo, realizamos a síntese de um derivado de naftaleno *N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanoato (DHPN), a partir do 1,4-dimetilnaftaleno, de acordo com Lock & Walter (1942); Marvel & Wilson (1989); Martinez et al. (2000). Depois, por fotossensibilização com azul de metileno, foram sintetizados endoperóxidos do DHPN utilizando tanto O_2 isotopicamente marcado com o isótopo 18 do oxigênio ($\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$), quanto oxigênio não marcado (DHPNO_2), para melhor atribuir a incorporação dos átomos de oxigênio à MEL. A termodecomposição em 37°C do $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$ e do $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ liberam $^{18}[\text{}^1\text{O}_2]$ e $^1\text{O}_2$, respectivamente com um alto rendimento (DI MASCIO & SIES, 1989), sem a liberação de outros intermediários reativos, de acordo com o esquema 7.1.

Esquema 7.1. – Termodecomposição do endoperóxido DHPNO_2 , gerando $^1\text{O}_2$.

A figura 7.2. mostra esquematicamente a síntese do DHPNO₂, a partir do 1,4-dimetilnaftaleno (DMN), como segue.

Figura 7.2. – Rota de síntese do DHPN¹⁸O₂, a partir do DMN. Os detalhes experimentais estão descritos no texto.

O primeiro passo na síntese do DHPN, foi a bromação radicalar do DMN. Para tanto, 20 mL do DMN e 250 mL de tetracloreto de carbono (CCl₄) foram colocados em um balão de 1 L com três bocas. A uma das bocas do balão, foi acoplado um funil de adição contendo 15 mL de bromo (Br₂), o qual foi adicionado durante 2 horas, agitando-se com o auxílio de um agitador magnético. Durante este período, o sistema permaneceu aquecido, sob refluxo (através de condensador de refluxo acoplado à segunda boca do balão), e irradiado com luz fornecida por duas lâmpadas de 500 watts. Ao término da adição, o sistema permaneceu sob refluxo por mais quatro horas, ficando após este período sob repouso *overnight*, à temperatura ambiente. No dia seguinte, o solvente foi evaporado em um rotoevaporador e o produto foi recristalizado com clorofórmio (CHCl₃). Após

permanecer por cerca de 8 horas em 5°C , o sólido (1,4-bis(bromometil)naftaleno, BBMN) foi recuperado em funil de Büchner.

O próximo passo foi uma síntese malônica. Para esta etapa, os solventes utilizados foram previamente tratados da seguinte forma:

- a) Etanol seco: Em um balão de 1 L, foram colocados 500 mL de etanol absoluto, ao qual 2,5 g de magnésio metálico foi adicionado lentamente. Após este procedimento, 0,5 g de iodo ressublimado (I_2) foi adicionado à solução, que permaneceu sob refluxo por duas horas. O solvente foi recuperado por destilação.
- b) Benzeno seco: Em um balão de 1 L, foram colocados 600 mL de benzeno mais 3 g de sódio metálico na forma de fio. O sistema ficou sob refluxo por uma hora e o solvente recuperado por destilação.
- c) Éster malônico: 250 mL de éster malônico foi destilado à pressão reduzida (122°C).

Após o tratamento dos solventes, iniciou-se a síntese malônica. Em um balão de três bocas de 1 L, foram colocados 200 mL do etanol seco, que ficou sob constante agitação, aquecimento e refluxo. Ao etanol seco, foi adicionado lentamente, durante 1 hora, 6 g de sódio metálico. Em seguida, com o auxílio de um funil de adição que foi acoplado à uma das bocas do balão, 80 mL do éster malônico foram adicionados à solução, gotejando por cerca de 2 horas e meia. Durante este procedimento, a temperatura foi controlada para ficar em torno de 50°C . Após a adição de todo o éster malônico, o sistema permaneceu sob refluxo por 2 horas, quando então, 320 mL do benzeno seco foram adicionados, para facilitar a dissolução do BBMN, que foi adicionado aos poucos (20 g durante cerca de 30

minutos). Após todo o BBMN dissolver na solução, o sistema ficou sob refluxo durante 4 horas e em seguida à temperatura ambiente *overnight*.

No dia seguinte, a solução foi neutralizada com 80 mL de água mais 80 mL de ácido clorídrico (HCl) 20%, o que resultou na formação de duas fases, uma aquosa e outra orgânica. A fase aquosa foi lavada com éter, e então as duas fases orgânicas foram unidas e lavadas com 5 % de bicarbonato de sódio e água. Em seguida os solventes foram eliminados por rotoevaporação.

O éster obtido (α,α' -dicarbetoxy-1,4-naftalenobispropanoato de etila) foi dissolvido em 160 mL de solução 6 M de NaOH e 50 mL de metanol, dentro de um balão de 500 mL. O sistema permaneceu então sob refluxo por duas horas, com agitação. Ao final, foi realizada uma filtração a quente e acrescentou-se ao filtrado HCl até a solução ficar com pH ácido, formando um precipitado. Esta solução permaneceu em geladeira *overnight*, e o sólido obtido foi recuperado por filtração.

Em seguida, o sólido foi colocado em uma estufa, com a temperatura ajustada para 120 °C, e lá foi mantido por 15 dias para a sua descarboxilação, resultando na formação do produto 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanóico (NDP).

Na etapa seguinte, em um balão de 250mL equipado com condensador de refluxo, foram colocados 21 g do NDP, 150 mL de álcool etílico absoluto e 1 mL de ácido sulfúrico. Adicionou-se alguns pequenos pedaços de porcelana porosa, e manteve-se o sistema sob refluxo por 2 horas. Após este período, 40 mL de tolueno foi adicionado à solução e um *dean stark* contendo tolueno foi acoplado entre o balão e o condensador de refluxo, para a retirada de água da solução reagente. Este sistema permaneceu sob refluxo por aproximadamente 3 horas, e ao final os solventes foram eliminados por destilação.

O produto formado, o 3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanoato de etila (NDE), foi extraído com 200 mL de solução de cloreto de sódio 20 % e 50 mL de éter etílico, sendo que a fase apolar foi lavada com mais 200 mL de solução bicarbonato de sódio 5 % e seca sob sulfato de magnésio anidro. Esta solução foi filtrada para a retirada do sulfato de magnésio e rotoevaporada para a eliminação do solvente orgânico.

Na seqüência, aproximadamente 3 gramas do NDE e 100 mL de metanol puro foram colocados em um balão de 250 mL. Após o produto ter dissolvido totalmente no metanol, 6 g de 3-amino-1,2-propanodiol foi adicionado, e o sistema ficou sob refluxo por 36 horas.

O metanol foi então eliminado por rotoevaporação e o produto (DHPN na forma de um óleo) transferido para um bequer de 500 mL ao qual foi adicionado cerca de 200 mL de acetona, sob agitação. Após a precipitação do DHPN, a solução permaneceu em geladeira *overnight*. No dia seguinte o produto foi recuperado por filtração em funil de Büchner e procedeu-se uma recristalização do DHPN em metanol, o qual foi recuperado por filtração.

O produto final foi caracterizado por RMN de ^1H , sendo que uma amostra do produto foi dissolvida em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO). Outra alíquota do produto foi analisada por HPLC com detector UV programado para a detecção em comprimento de onda de 230 nm. A coluna utilizada foi a LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 μm) da Supelco. A separação foi feita com fluxo de 0,8 mL/min de forma isocrática com fase móvel constituída por 15 % ACN e 85 % água. Após o detector UV, uma parte do fluxo (0,22 mL/min) era derivada para o espectrômetro de massas para a análise no modo positivo, com temperatura da fonte de 80 °C e diferentes potenciais do cone na faixa de 5 a 20 V.

Ao final da síntese do DHPN, obtivemos um total de 2,7 g de um produto de cor levemente amarelada. Como partimos de 20 mL do DMN (0,128 mol) e obtivemos 2,7 g do produto final (0,0065 mol), o que representou um baixo rendimento (5%). A figura 7.3. representa o espectro de RMN de ^1H do produto final obtido, confirmando que o DHPN foi corretamente sintetizado. As atribuições dos sinais foram feitas com base no trabalho publicado por Martinez *et al.* (2000). Na figura 7.4. temos o espectro de massas do produto final obtido ($m/z = 419$), confirmando se tratar do DHPN.

Figura 7.3. – Espectro de RMN de ^1H do DHPN em DMSO, indicando as atribuições dos prótons na molécula de acordo com Martinez *et al.* (2000).

Figura 7.4. – Espectro de massas do DHPN.

7.4. Síntese do endoperóxido do *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanoato com oxigênio marcado isotopicamente (DHPN¹⁸O₂) e não marcado (DHPNO₂)

Para a síntese do endoperóxido com oxigênio não marcado, 200 mg do DHPN foram dissolvidos em 2 mL de água deuterada, contendo 20 μ L de uma solução de azul de metileno (6 mg/mL). Esta solução foi irradiada com uma lâmpada de 500 W sob aeração por 4 h., mantendo-se a temperatura a 4°C.

Então 400 mg de resina Chelex® 100 foi acrescentada e a solução foi agitada por 20 min a 3 °C até completa fixação do azul de metileno. A solução foi filtrada em uma membrana polimérica (0.45 μ m) e estocada a -80 °C.

Para a síntese do endoperóxido com oxigênio marcado (DHPN¹⁸O₂), 200 mg do DHPN foram dissolvidos em 2 mL de água deuterada, contendo 20 µL de uma solução de azul de metileno (6 mg/mL). Esta solução foi congelada seguido de vácuo por três vezes, para a retirada de oxigênio não marcado da solução, e então irradiada com uma lâmpada de 500 W sob pressão de oxigênio marcado (¹⁸O₂) por 4 h., mantendo-se a temperatura a 4°C.

Da mesma forma, 400 mg de resina Chelex® 100 foi acrescentada e a solução foi agitada por 20 min a 3 °C até completa fixação do azul de metileno. A solução foi filtrada em uma membrana polimérica (0.45 µm) e estocada a -80 °C.

Para o estudo da oxidação da MEL pelo ¹O₂ liberado neste sistema, aproximadamente 1 mM de MEL (em água) foi incubado com 10 mM do DHPNO₂ ou DHPN¹⁸O₂ por 1 hora, à 37 °C.

7.5. Análise dos resultados

A figura 7.5. mostra um cromatograma de HPLC a 275 nm, indicando separação da MEL e seu produto de oxidação formado tanto pela fotosensibilização com azul de metileno como pela oxidação com o ¹O₂ gerado pela termodecomposição do DHPNO₂. Os espectros de absorção UV da MEL e seu produto de oxidação são também mostrados nesta figura.

Figura 7.5. – Cromatogramas da injeção de A: MEL oxidada pelo $^1\text{O}_2$ liberado através da termodecomposição do DHPNO₂; B: MEL oxidada pelo $^1\text{O}_2$ usando azul de metileno como fotosensibilizador. Do lado direito são apresentados os espectros de UV da MEL (C) e do produto de oxidação da MEL (D). 1) produto de oxidação da MEL, 2) MEL, e 3) DHPN.

Como podemos observar, a fotooxidação da MEL formou um produto que apresentava grande absorção ultra violeta (UV) entre os comprimentos de onda de 320 e 380 nm (figura 7.5.D), apesar de a MEL não apresentar absorção UV acima de 320 nm (figura 7.5.C).

Alguns dados da literatura mostram que certas EROs, principalmente H_2O_2 , ao reagirem com a MEL formam um composto com grande absorção ultra violeta na região de 320 a 380 nm (TAN *et al.*, 2000; XIMENES *et al.*, 2001). A caracterização deste produto indicou se tratar do composto AFMK, o qual é gerado em presença de metais através da formação de um epóxido intermediário seguido da hidrólise deste epóxido formando um diól que é então oxidado abrindo o anel indólico e formando o AFMK (TAN *et al.*, 2000).

Inoue *et al.* (1982) relataram a abertura do anel indólico e formação de uma quinurenina (KYN) quando triptofano foi oxidado pelo $^1\text{O}_2$. Sendo assim, nossa suspeita inicial era de que a reação do $^1\text{O}_2$ com a MEL viria a produzir o mesmo composto que foi produzido pela reação com H_2O_2 , através de um mecanismo diferente, como de fato proposto anteriormente (ANDRISANO *et al.*, 2000).

Ao analisarmos o produto por espectrometria de massas, verificamos que este apresentava dois picos principais, sendo um em $m/z = 265$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e outro em $m/z = 287$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), indicando que o produto possuía a mesma massa do produto AFMK (figura 7.6.B). Levando-se em consideração que a MEL possui uma razão $m/z = 233$ Da (figura 7.6.A), isto corresponderia a um acréscimo de 32 Da de massa à molécula da MEL, indicando a incorporação de dois átomos de oxigênio à MEL.

Figura 7.6. – Espectros de massas da injeção de um padrão de MEL (A), e do produto de oxidação pelo oxigênio singlete (B). Em B, a estrutura molecular refere-se ao AFMK.

O próximo passo seria a produção do produto de oxidação da MEL em grande quantidade para a sua caracterização por RMN. Entretanto, devido aos problemas da utilização de fotossensibilização com azul de metileno como fonte de $^1\text{O}_2$ descritos anteriormente, procedemos a oxidação da MEL pelo $^1\text{O}_2$ liberado pela termodecomposição do DHPNO₂. Como mostrado na 7.5., os perfis de HPLC dos dois sistemas de oxidação (azul de metileno e DHPNO₂) foram idênticos, e os compostos apresentaram os mesmos espectros de UV. Baseado neste resultado e no fato de que o produto formado no sistema com DHPNO₂ também apresentou um sinal mais intenso no espectrômetro de massas em $m/z = 265$ (dado não mostrado), isto nos levou a crer que o produto formado nos dois sistemas foi o mesmo.

Ainda assim, para se ter realmente certeza de que os átomos de oxigênio incorporados à MEL eram provenientes do $^1\text{O}_2$, utilizamos o endoperóxido isotopicamente marcado (DHPN¹⁸O₂), como fonte de $^1\text{O}_2$ marcado ($^{18}[^1\text{O}_2]$).

A figura 7.7. mostra o espectro de massas do produto de oxidação da MEL neste sistema. Como podemos observar, a oxidação da MEL pelo $^{18}[^1\text{O}_2]$ gerou um produto que apresentou quatro picos principais, em: $m/z = 265$ e 267 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), e $m/z = 287$ e 289 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$). Estes picos indicariam a incorporação de dois átomos de oxigênio não marcados à MEL ($m/z = 265$ e 287 , para o íon molecular mais seu respectivo aduto de sódio) e de apenas um oxigênio isotopicamente marcado ($m/z = 267$ e 289 , para o íon molecular e seu respectivo aduto de sódio), além de picos de menor intensidade.

Diversos estudos tem demonstrado que compostos carbonílicos como cetonas, ácidos carboxílicos e principalmente aldeídos, apresentam uma alta taxa de troca de oxigênio com o solvente, dependendo do solvente utilizado (BENDER & THOMAS, 1961; COHN & URBY, 1938; BELL & McDOUGALL, 1960). Assim, o fato da inobservância de

um pico correspondendo à incorporação de dois átomos de oxigênio marcados, provavelmente está relacionada à troca de um ou os dois átomos do oxigênio marcado do do produto com um oxigênio não marcado da água. Outros picos intermediários aos de maior intensidade poderiam estar associados a troca de átomos de hidrogênio do composto com deutério (apesar de a reação ter sido feita em água, o DHPN¹⁸O₂ estava dissolvido em água deuterada).

Figura 7.7. – Espectro de massas do produto de oxidação da MEL pelo ¹⁸O₂ isotopicamente marcado (¹⁸[¹O₂]). As estruturas moleculares indicam a incorporação de 2 átomos de oxigênio não marcados assim como a incorporação de 1 oxigênio isotopicamente marcado à MEL.

Numa tentativa de se contornar o problema de troca de oxigênio, tentamos sintetizar o DHPNO₂ em outros solventes tais como metanol, clorofórmio e dimetilformamida, porém obtivemos um rendimento muito baixo na formação do endoperóxido, o que impossibilitou a sua utilização. Apesar disso, concluímos que os dados apresentados aqui foram suficientes para afirmar que os átomos de oxigênio incorporados à MEL, eram provenientes do ¹O₂.

Por fim, iniciamos a síntese do produto de oxidação da MEL em grande quantidade para a caracterização por RMN e, sendo assim, a total elucidação de sua estrutura. Como o produto obtido através da oxidação pelo DHPNO₂ foi o mesmo obtido utilizando o sistema com azul de metileno, então optamos por utilizar este último, por ser de custo bem menor.

7.6. Separação do produto de oxidação da MEL para a caracterização por RMN de próton (¹H), carbono (¹³C) e dept135

A MEL é bem pouco solúvel em água, sendo solúvel a um limite próximo de 2 mM. Por isso, 50 mg de MEL foram diluídos em 3 mL de metanol, contendo 25 µL de solução de azul de metileno 6mg/mL e fotosensibilizada de acordo com a metodologia descrita anteriormente. Entretanto, apesar da maior solubilidade, o rendimento da oxidação da MEL neste solvente foi bem menor do que em água. Como mostra a 7.8., após 40 min de fotooxidação da MEL em água, praticamente toda a MEL foi consumida gerando um produto principal. Em metanol, apenas cerca de 60 % da MEL foi consumida após 3 horas de fotosensibilização, o que também pode ser devido à maior concentração da MEL em metanol.

Figura 7.8. – Cinética da oxidação da MEL pelo $^1\text{O}_2$ gerado pela fotosensibilização com azul de metileno em água (A) e em metanol (B).

Após as 3 horas de fotosensibilização, cerca de 300 mg de resina Chelex® 100 foram adicionados à solução, permanecendo sob agitação por 20 minutos para a fixação do

azul de metileno. A solução foi então filtrada e alíquotas de 150 μ L foram injetadas no HPLC, bombeando um gradiente de 20 a 40 % de metanol em água em 20 minutos, através de uma coluna semi-preparativa SUPELCOSIL LC8 (250 x 10 mm, 5 μ m), sob fluxo de 4,5 mL/min. As amostras foram monitoradas a um comprimento de onda de 270 nm, e o produto de oxidação foi coletado no seu respectivo tempo de retenção.

Após toda a solução de fotossensibilização ser injetada no HPLC e todo o produto ser coletado, a solução de coleta foi liofilizada, sendo que ao final cerca de 10 mg do produto foram obtidos. O produto purificado foi então dissolvido em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e submetido às análises de RMN. As análises de ^1H RMN foram procedidas em um aparelho Varian 300 MHz, a de ^{13}C em um Bruker 500 MHz e de dept135 em um Bruker 300 MHz.

A figura 7.9. mostra o espectro de RMN de ^1H do produto, o qual foi idêntico ao do produto AFMK apresentado por Tan *et al.* (2000). Os deslocamentos químicos, constantes de acoplamento bem como as atribuições dos sinais são apresentados na tabela 7.1.

Figura 7.9. – Espectro de RMN de ^1H do produto de oxidação da MEL, em clorofórmio deuterado, indicando as atribuições de cada hidrogênio ao AFMK.

Tabela 7.1. – Multiplicidade, deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos prótons do produto AFMK, bem como a estrutura deste produto, indicando os sinais de RMN observados.

N-acetil-N-formil-5-metoxiquinurenina

Próton	Multiplicidade	δ (ppm)	J (Hz)
TMS	Singlete	0	
H₂O	Singlete	1,6	
H _a	Singlete	1,97	
H _b	Tripleto	3,26	
H _c	Quarteto	3,63	Hf-Hi – 9
H _d	Singlete	3,82	Hf-Hg – 3
H _e	Singlete	6,02	Hb-Hc – 12
H _f	Duplo dubleto	7,13	
CDCl₃	Singlete	7,24	
H _g	Dubleto	7,36	
H _h	Singlete	8,43	
H _i	Dubleto	8,66	
H _j	Singlete	11,19	

As figuras 7.10. e 7.11. apresentam os espectros de RMN de ^{13}C e dept 135 (para atribuição dos sinais correspondentes a CH , CH_2 e CH_3), respectivamente, do produto de oxidação da MEL pelo $^1\text{O}_2$. As atribuições foram feitas com base nos deslocamentos químicos característicos e em comparação com os espectros obtidos por Fang *et al.* (1998), com o éster metílico do N_a -formil- N_b -acetilquinurenina.

Figura 7.10. – Espectro de RMN de ^{13}C do produto de oxidação da MEL (AFMK), em clorofórmio deuterado, indicando os sinais correspondentes para cada carbono da molécula.

Figura 7.11. – Espectro de RMN de dept135 do produto de oxidação da MEL pelo $^1\text{O}_2$, em clorofórmio deuterado, indicando as atribuições dos sinais aos carbonos da molécula.

Considerando os dados apresentados, podemos concluir que a oxidação da MEL pelo $^1\text{O}_2$ produz o mesmo composto gerado pela oxidação pelo H_2O_2 , o AFMK, descrito por Tan *et al.* (2000), apesar de os mecanismos de reação serem provavelmente distintos. No caso da reação da MEL com $^1\text{O}_2$, ocorreria a formação de um dioxietano intermediário, o qual seria hidrolizado produzindo o AFMK, de acordo com a figura 7.12.

Figura 7.12 – Mecanismo proposto para a formação do AFMK (B) a partir da reação da MEL com o ${}^1\text{O}_2$ liberado pela termodecomposição do DHPN ${}^{18}\text{O}_2$ (A).

A maioria das KYN, tais como o AFMK, são compostos geralmente associados à produtos de abertura do anel aromático de compostos derivados indóis, tais como a MEL, 5HT e triptofano. Diversas KYN derivadas de triptofano já foram identificadas e são até hoje extensivamente estudadas, pois muitas de suas funções biológicas e níveis plasmáticos ou teciduais foram pouco estudadas (PAWLAK *et al.*, 2003). Muitos destes estudos têm relacionado a presença de determinadas KYN com diversas patologias em humanos (STONE *et al.*, 2001).

Se por um lado sabe-se pouco à respeito das KYN derivadas de triptofano, menos ainda se sabe à respeito das KYN derivadas da MEL. Dentre as KYN derivadas de MEL mais estudadas destaca-se o AFMK, o qual já foi demonstrado possuir propriedades antioxidantes *in vitro*. De acordo com dados da literatura, AFMK preveniu a formação de 8-oxodGuo em DNAs incubados com metais e H₂O₂, preveniu a peroxidação lipídica de homogenatos de fígado de ratos incubados também com metais e H₂O₂, e aumentou a viabilidade celular em culturas de células incubadas com H₂O₂ (TAN *et al.*, 2001). López-Burillo *et al.* (2003) também observaram um efeito protetor do AFMK contra a oxidação de bases em DNAs de timo de bezerro tratados com reagentes de Fenton.

Além disso, recentemente Silva *et al.* (2000) descreveram a oxidação de MEL catalizada pela enzima mieloperoxidase produzindo AFMK na presença de H₂O₂, em neutrófilos ativados. Estes autores propuseram que este processo pode estar envolvido na modulação de respostas celulares importantes, apesar de isto permanecer por ser testado.

Apesar de haverem alguns estudos recentes sobre as funções antioxidantes do AFMK, ainda não se sabe nada à respeito de seus níveis em sistemas biológicos. Por outro lado, existem indicativos de que este composto é produzido nos organismos (HIRATA &

HAYAISHI, 1974). Isto se deve principalmente ao fato de não terem sido desenvolvidas ainda técnicas suficientemente sensíveis de forma a se detectar níveis basais de AFMK nos organismos.

Recentemente foi publicado um método de detecção de AFMK em amostras biológicas por ensaio radioimune. Entretanto, esta técnica não demonstrou ser altamente sensível, de forma que não foram detectados níveis basais de AFMK *in vivo*, sendo que este composto só foi detectado em ratos previamente injetados com MEL.

Sabe-se que a concentração de MEL nos organismos é baixa, podendo variar de 0,2 até 5 pmol por mL de plasma (FALCÓN, 1999). Assim, menor ainda deve ser esperada a produção de AFMK. Desta forma, uma metodologia sensível e específica para a detecção deste metabólito *in vivo* permanecia por ser desenvolvida.

Portanto, na sequência dos estudos, pretendíamos oxidar uma grande quantidade de MEL para se obter também uma grande quantidade de AFMK para sua utilização no desenvolvimento de um método sensível de detecção deste composto em amostras biológicas, como será mostrado mais adiante.

Entretanto, de acordo com o que foi descrito até aqui, poderíamos utilizar dois sistemas para oxidar a MEL, obtendo-se o AFMK: 1) incubando a MEL com o DHPNO₂, ou 2) a fotosensibilização com metileno. A primeira opção exigiria uma grande quantidade de DHPNO₂, o que tornaria este esforço muito caro. A fotosensibilização com azul de metileno não poderia ser feita em água devido à baixa solubilidade da MEL neste solvente, e em metanol não apresentou um rendimento muito bom. Assim, seria de grande utilidade alguma forma alternativa de oxidação da MEL de modo a tornar a obtenção de AFMK mais eficiente ou pelo menos mais rápida.

De acordo com McKeown & Waters (1964) e Lu *et al.* (2001), $^1\text{O}_2$ pode ser gerado na reação de H_2O_2 com nitrilas em meio básico. Caso isto fosse verdadeiro, seria um bom método de oxidar grandes quantidades de MEL para a obtenção do AFMK, uma vez que a MEL é bastante solúvel em acetonitrila (ACN). No entanto, apesar de alguns mecanismos terem sido propostos para esta reação, baseados em estudos de quimioluminescência na região vermelha visível do espectro, feitos em fotomultiplicadoras, faltavam evidências diretas de que a espécie gerada fosse realmente o $^1\text{O}_2$. Por isso, antes de utilizar este sistema para oxidar a MEL, primeiramente optamos por estudar melhor o mecanismo de reação da ACN com H_2O_2 em meio alcalino.

O envolvimento do $^1\text{O}_2$ com a luminescência na região do vermelho foi elucidado por investigações espectroscópicas usando a reação entre H_2O_2 e hipoclorito por Khan & Kasha (1963 e 1964). Estes pesquisadores observaram a presença de duas bandas em 634 e 703 nm, as quais foram atribuídas à transição simultânea de duas moléculas do $^1\text{O}_2$ para o estado fundamental (emissão bimolecular do $^1\text{O}_2$, reação 1). A transição de uma única molécula de $^1\text{O}_2$ para o estado fundamental ocorre na região do infravermelho, em 1270 nm (emissão monomolecular do $^1\text{O}_2$, reação 2), e foi estudada por Browne & Ogrysló (1964) também usando o sistema H_2O_2 /hipoclorito.

De forma a confirmar esta hipótese, neste trabalho a reação do H_2O_2 com ACN foi estudada, usando: 1) a medida da quimioluminescência bimolecular do $^1\text{O}_2$ na região vermelha do visível ($\lambda > 610 \text{ nm}$), através de uma fotomultiplicadora na presença de filtros;

2) medidas de quimioluminescência monomolecular do $^1\text{O}_2$ na região do infravermelho (1270 nm) através de uma nova fotomultiplicadora desenvolvida em nosso laboratório, acoplada a um monocromador; e 3) detecção do produto acetamida formado ao final da reação, por espectrometria de massas.

7.7. Monitoramento da emissão monomolecular do $^1\text{O}_2$ gerado na reação entre ACN e H_2O_2 em meio básico

Neste estudo, em uma cubeta de vidro colocamos diferentes concentrações de ACN e 100 μL de solução de base (tipicamente uma solução de carbonato de sódio 1 M ou hidróxido de sódio 1 M) e uma solução de H_2O_2 foi injetada na cubeta por meio de uma seringa acoplada a uma bomba injetora (Syringe Pump Model 22, Harvard Apparatus, MA) sob fluxo de 0,7 mL/min. A luz emitida foi monitorada em 1270 nm. A solução final continha sempre 3 mL de volume total.

O aparelho consistia de uma fotomultiplicadora (R5509 PMT, Hamamatsu Photoniks KK, Shizuoka, Japão) refrigerada a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ por um cilindro de nitrogênio líquido (S600 PHOTOCOOL TM, PC176TSCE005 cooler, Products for Research Inc., MA), conectados a uma fonte de alta voltagem (Modelo C3360, Hamamatsu Photoniks KK, Shizuoka, Japão), e um monocromador (M300, Edinburgh Analytical Instruments, UK). A câmara de acondicionamento da cubeta era equipada com um termostato, permitindo o controle da temperatura. Os dados foram monitorados através de um microcomputador.

Como podemos observar na figura 7.13., durante os primeiros 50 s antes da injeção do H_2O_2 no sistema, nenhuma luz foi emitida no comprimento de onda de 1270 nm. No entanto, ao injetar-se H_2O_2 no sistema, uma grande quantidade de luz foi emitida neste

comprimento de onda. Adicionando diferentes concentrações de azida de sódio (um conhecido supressor de $^1\text{O}_2$) ao sistema, pudemos observar que a emissão de luz foi suprimida.

Fazendo-se uma varredura da luz emitida (figura 7.14), pudemos constatar uma emissão máxima em 1270nm, correspondendo à mesma emissão da geração de $^1\text{O}_2$ por um padrão do endoperóxido do dimetil-naftaleno (DMNO₂) e pela reação de hipoclorito com H₂O₂.

Além disso, pudemos observar que a emissão de luz era altamente dependente da temperatura e da concentração tanto de ACN como do H₂O₂ (figura 7.15.). Quanto maior a temperatura e as concentrações de H₂O₂ e/ou ACN, maior foi a intensidade da luz emitida.

Figura 7.13. – Emissão de luz em 1270 nm pela reação de ACN com H₂O₂ em meio alcalino. a) ausência de um dos reagentes (ACN, H₂O₂ ou base). b) Emissão de luz após a injeção de H₂O₂ (seta) na cubeta contendo ACN e base. c) efeito supressor da azida de sódio (NaN₃) na emissão de luz.

B*

C*

Figura 7.14. – Varredura da emissão de luz pelas reações de ACN com H_2O_2 em meio básico (A), pelo DMNO_2 (B) e pela reação de hipoclorito com H_2O_2 (C). Abaixo, os mecanismos de geração da ${}^1\text{O}_2$ pelo DMNO_2 (B*) e pela reação do H_2O_2 com OCl^- (C*).

Figura 7.15. – Efeito da temperatura, da concentração de ACN e da concentração de H₂O₂ na emissão de luz em 1270 nm, pela reação de ACN com H₂O₂ em meio alcalino. A seta indica o momento em que H₂O₂ foi injetado.

7.8. Monitoramento da emissão bimolecular do $^1\text{O}_2$ gerado na reação entre ACN e H_2O_2 em meio básico

A emissão bimolecular do $^1\text{O}_2$ gerado na reação da ACN com H_2O_2 em meio básico, foi monitorada através de um sistema contador de fótons, equipado com uma fotomultiplicadora sensível à região da luz visível, resfriada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. O potencial aplicado na fotomultiplicadora foi de 1,2 kV, e os dados foram adquiridos por meio de um microcomputador. O monitoramento da luz emitida pelo sistema em comprimentos de onda $\lambda > 610\text{ nm}$ foi possível utilizando filtros específicos (Melles Griot visible filters 03FCG101), colocados entre a cubeta de amostra e a fotomultiplicadora. A cubeta contendo amostras (35 mm x 6 mm x 55 mm) foi acondicionada dentro do aparelho, o qual era equipado com um termostato, permitindo que a temperatura dentro da cubeta fosse mantida a $40\text{ }^\circ\text{C}$. Tipicamente, 2 mL de soluções 4 ou 10 M de H_2O_2 foram injetados através de uma seringa (fluxo de 0,7 mL/min por meio de uma bomba de seringa, Syringe Pump Model 22, Harvard Apparatus, MA), dentro da cubeta que continha 2 mL de acetonitrila 100%, 1,8 mL de água MilliQ e 0,2 mL de solução carbonato de sódio 1 M.

Como mostrado anteriormente, a emissão monomolecular do $^1\text{O}_2$ (reação 1) foi monitorada em uma fotomultiplicadora sensível à região do infravermelho, para se testar a hipótese de que a reação de nitrilas com H_2O_2 em meio básico geraria $^1\text{O}_2$ (McKeown & Waters, 1964).

A figura 7.16. mostra a luz emitida na região do visível ($\lambda > 610\text{ nm}$) quando H_2O_2 foi injetado na cubeta contendo ACN em meio básico, assim como a supressão da emissão de luz quando adicionou-se azida de sódio ao sistema, indicando que a luz emitida deve ser proveniente da transição de duas moléculas de $^1\text{O}_2$ para o estado fundamental.

Figura 7.16. – Luz emitida na região visível do espectro, após a injeção de H_2O_2 na cubeta (seta) contendo ACN em meio básico (a), e sua supressão quando se injeta azida de sódio (NaN_3) ao sistema (b).

Utilizando um filtro do tipo “band pass” entre a cubeta e a fotomultiplicadora, permitindo a passagem de luz apenas nas regiões entre 690 e 710 nm, pode-se atribuir a luz emitida apenas pela banda de emissão do $^1\text{O}_2$ em 703 nm (figura 7.17.).

Figura 7.17. – Luz emitida após a injeção de H_2O_2 ao sistema (seta), permitindo apenas a passagem de luz nos comprimentos de onda entre 690 e 710 nm.

7.9. Análise do produto acetamida gerado na reação do H_2O_2 com a ACN em meio básico, por espectrometria de massas

A acetamida gerada na reação da ACN com H_2O_2 em meio básico foi determinada por cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas por *spray* de elétrons (LC/ESI/MS) operando no módulo positivo, em um aparelho como previamente descrito. A voltagem do cone e a temperatura da fonte foram ajustadas em 20 V e 100 °C, respectivamente. O espectro de massas foi obtido monitorando as massas entre 40-100 m/z , e está apresentado na figura 7.18. Como pode-se observar, este mostrou dois sinais mais

intensos em $m/z = 60$ e 82 , para a acetamida e seu respectivo aduto de sódio, e um em $m/z = 64$, para o aduto formado entre ACN e o sódio.

Figura 7.18. – Produto acetamida formado na reação do H_2O_2 com acetonitrila em meio básico, detectado por espectrometria de massas, no módulo *electrospray* positivo.

Baseado nos resultados apresentados, pudemos concluir que a reação da ACN com H_2O_2 em meio básico realmente gera 1O_2 . O mecanismo proposto para esta reação é primeiramente um ataque nucleofílico pelo ânion peróxido formado em solução alcalina

(-OOH) no carbono da nitrila, seguido da reação de uma segunda molécula de H_2O_2 gerando acetamida (figura 7.19.).

Figura 7.19. – Mecanismo de reação do H_2O_2 com ACN em meio alcalino, produzindo água, acetamida e $^1\text{O}_2$.

A partir desta comprovação, utilizamos este sistema para oxidar a MEL. Assim, aproximadamente 80 mg de MEL foram dissolvidos em 3 mL de ACN e 1 mL de peróxido de hidrogênio 30 %, e 200 μL de NaOH 1 M foram adicionados. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (*thin layer chromatography*, TLC) por 4 horas, quando então a solução foi seca sob nitrogênio, re-dissolvida em 1 mL de acetonitrila e aplicada em placas de TLC preparativa previamente preparadas com sílica gel 60 PF₂₅₄. A separação dos produtos nas placas se deu utilizando acetato de etila como fase móvel. Após a fase percorrer toda a placa, a região onde se encontrava o AFMK foi identificada com o auxílio de uma lâmpada de ultravioleta. Estas regiões foram raspadas das placas e o produto

extraído da sílica com metanol. A fração metanólica foi então seca sob nitrogênio e o produto obtido (cerca de 15 mg) foi congelado a -20 °C, para ser utilizado como padrão no desenvolvimento de uma nova metodologia de detecção de MEL e AFMK em amostras biológicas, como apresentado a seguir. Apesar de este sistema de oxidação da MEL se mostrar mais rápido e fácil do que os utilizados anteriormente neste trabalho, apresentou um rendimento muito baixo na formação do produto AFMK (cerca de 19 %). Isto pode ser decorrente da formação de outros produtos durante a oxidação da MEL neste sistema, fato que foi comprovado a partir da observação de diversas outras bandas de compostos de cor amarelada nas placas de TLC. Entretanto, estes outros produtos formados não foram estudados neste trabalho.

7.10. Síntese de MEL e AFMK marcados com três átomos de deutério, para utilização como padrões internos em análises quantitativas por espectrometria de massas.

Muito tem se falado sobre as vantagens do uso de espectrometria de massas para a quantificação de compostos em amostras biológicas, uma vez que os espectrômetros modernos demonstram alta sensibilidade e precisão na determinação de diversos compostos.

Entretanto, para se fazer uma análise em espectrometria de massas é necessário que a amostra esteja ionizada, e a detecção se dá sempre através das razões massa/carga (m/z) dos íons formados, e isto muitas vezes é um fator complicante na quantificação dos compostos, pois as condições de ionização das amostras injetadas podem não ser as mesmas de uma injeção para outra. Desta forma, é recomendado utilizar sempre padrões internos em análises quantitativas em espectrometria de massas. Entretanto, estes padrões

internos necessitam ter alguma característica que os diferenciem do composto que se quer analisar.

Por este motivo, os padrões internos ideais são aqueles isotopicamente marcados, pois terão a mesma estrutura, os mesmos perfis cromatográficos, os mesmos tempos de retenção nas separações, porém massas diferentes, o que permite analisar as amostras em dois canais simultâneos, um correspondendo à massa original do composto (amostra) e outro correspondendo à incorporação da massa dos isótopos do padrão interno adicionado. Assim, um padrão marcado com um nitrogênio 15 por exemplo, terá 1 Da a mais de massa que o composto presente na amostra, correspondendo ao nitrogênio 14.

Existem poucos trabalhos de análise de MEL em amostras biológicas por espectrometria de massas, e destes muito poucos utilizam padrões internos apropriados para este tipo de análise. Quanto ao seu produto de oxidação AFMK, não existem dados referindo-se à sua análise por espectrometria de massas em amostras biológicas. Neste sentido, resolvemos sintetizar ambos os compostos marcados com três átomos de deutério, como segue.

Para a síntese da MEL marcada (MELD₃, figura 7.20.), 1 mmol de 5-metóxitriptamina (5MT) foi dissolvido em 1 mL de diclorometano seco, contendo 200 µL de trietilamina seca (para a dissolução do HCl gerado na reação). Em seguida, 0,1 mL de cloreto de acetila deuterado (1,2 mmol) foi adicionado e a solução ficou agitando com o auxílio de um agitador magnético.

A reação foi acompanhada TLC, correndo alíquotas da solução juntamente com padrões de 5MT e MEL a cada 30 minutos, utilizando acetato de etila como fase móvel. Após 1,5 horas de reação, praticamente todo precursor 5MT foi consumido e observou-se

uma banda principal correspondendo ao tempo de retenção do padrão de MEL. A quantificação do produto formado por HPLC e espectroscopia UV (baseado no valor do ϵ da melatonina em água, $\epsilon_{280\text{nm}} = 3939,1$), indicou que 900 μmol de melatonina foram formados na reação, representando portanto um rendimento de 90 % da reação.

Figura 7.20. – Esquema da síntese da MELD₃ e AFMKD₃.

Uma alíquota desta solução foi diluída e analisada por HPLC e espectrometria de massas e uma outra alíquota foi fotosensibilizada com azul de metileno como descrito anteriormente, para a obtenção dos padrões de AFMK marcado (AFMKD₃). Posteriormente, o azul de metileno foi extraído da solução com resina Chelex® 100 e a solução também analisada por HPLC e espectrometria de massas.

O sistema de HPLC utilizado consistia de um detector de UV *photodiodearray* SPD-M10A VP (Shimadzu, Kyoto, Japão), monitorando as amostras entre os comprimentos de onda de 200 a 370 nm, duas bombas modelo LC-10AD (Shimadzu), bombeando os solventes (gradiente de metanol de 20 a 40 % em água) e coluna analítica SUPELCOSIL LC18 (150 X 4,6 mm, 5µm, Supleco). Os cromatogramas foram adquiridos com o auxílio do *software* Class VP 5.032.

Alíquotas de 5 µL foram injetadas diretamente no espectrômetro de massas, operando no módulo *electrospray ionization* positivo (ESI/MS), em um espectrômetro Quattro II (Micromass, Manchester, U.K.). O espectrômetro teve a voltagem do cone e temperatura da fonte ajustada para 15 V e 80°C, respectivamente. A fase móvel consistia de água/acetonitrila (1:1 volumes), bombeada sob fluxo de 10 µL/min.

Experimentos de fragmentação de ambos os compostos foram também realizados para a verificação da formação dos íons filhos gerados para cada composto. Para tanto, a energia de colisão no segundo quadrupolo (câmara de colisão) foi ajustada para 15 V.

7.11. Desenvolvimento da técnica de detecção de MEL e AFMK em amostras biológicas por HPLC acoplado a espectrometria de massas por *spray* de elétrons no módulo positivo (HPLC/ESI/MS), através de experimentos de “Multiple Reaction Monitoring” (MRM)

A figura 7.21. mostra os dados de espectrometria de massas da MEL e da MELD₃ sintetizada. Como mostrado anteriormente, a MEL possui massa de 232 Da, logo sua razão m/z para o íon $[M+H]^+$ é igual a 233. Sendo assim, uma molécula de MEL contendo três átomos de deutério (MELD₃) deveria gerar um sinal correspondendo ao íon $[M+H]^+$ em $m/z = 236$, como de fato obtido.

A figura 7.22. apresenta os dados das análises do AFMK e AFMKD₃ por espectrometria de massas. Como mostrado anteriormente, o padrão indicava um pico em $m/z = 265$ ($[M+H]^+$). O produto marcado AFMKD₃ deveria então gerar um pico em $m/z = 268$ para o íon molecular, como também observado.

As figuras 7.23. e 7.24. apresentam os dados referentes à formação de íons filhos pela fragmentação da MEL e do AFMK marcados e não marcados, respectivamente, no segundo quadrupolo. Como podemos observar, tanto a MEL como a MELD₃ geram os mesmos íons filhos em $m/z = 174$, correspondentes à perda do grupo *N*-acetil. Ambos AFMK e AFMKD₃ também geraram os mesmos íons filhos em $m/z = 178$, correspondente a perda tanto do grupo *N*-acetil quanto do grupo *N*-formil.

Estes dados possibilitam a análise quantitativa de MEL e AFMK por MRM (*multiple reaction monitoring*), ou seja, pela monitoração das transições $m/z = 265 - 178$ e $268 - 178$ para o AFMK (amostra) e AFMKD₃ (padrão interno), e $m/z = 233 - 174$ e $236 - 174$ para a MEL (amostra) e MELD₃ marcada (padrão interno), respectivamente, como mostrado a seguir.

Figura 7.21. – Espectro de massas da MEL (A) e do produto obtido (MELD₃) após a reação de 5-metóxitriptamina com cloreto de acetila deuterado (B).

Figura 7.22. – Espectros de massas do produto de fotooxidação da MEL, o AFMK (A) e da MELD₃, o AFMKD₃ (B).

Figura 7.23. – Íons filhos obtidos após a fragmentação da MEL (A) e da MELD₃ (B), na câmara de colisão com energia de colisão de 15 V.

Figura 7.24. - Íons filhos obtidos após a fragmentação do AFMK (A) e do AFMKD₃ (B), na câmara de colisão com energia de colisão de 15 V.

7.12. Extração da melatonina e AFMK de amostras de plasma humano e detecção por HPLC/ESI/MS no módulo MRM

Para a detecção do AFMK e MEL em amostras biológicas, amostras de plasma humano foram adquiridas de um banco de plasma. Alíquotas de 1 mL deste plasma foram separadas, às quais adicionaram-se os padrões internos da MELD₃ e AFMKD₃, em concentrações fixas de 1 pmol. Dois diferentes métodos de extração foram testados:

- a) Extração líquido/líquido (Tsang *et al.*, 1996): 1 mL de diclorometano foi adicionado à amostra do plasma, o qual foi agitado diversas vezes e então submetidos à centrifugação a 3000 rotações por minuto, por 10 minutos. Ao final, a fase de diclorometano foi coletada e seca sob nitrogênio. O resíduo foi então ressuspenso em 40 µL de metanol, sendo que 20 µL foram injetados no HPLC acoplado ao espectrômetro de massas.
- b) Pré-purificação por colunas de extração em fase sólida (SPE) C18 (Laganà *et al.*, 1995): Nesta extração, primeiramente equilibrou-se a coluna SPE com 2 mL de água MilliQ, e posteriormente 1 mL do plasma foi adicionado. Em seguida, o plasma foi eluído com 2 mL de água mais 2 mL de água/metanol (90/10 %). A melatonina foi então extraída da coluna com 2 mL de água/metanol (40/60 %), e a solução foi então seca por liofilização. Ao resíduo, adicionou-se 40 µL de metanol, sendo que 20 µL desta solução foram injetados no HPLC acoplado ao espectrômetro de massas.

Após feitos algumas análises testes por espectrometria de massas com as duas diferentes metodologias de extração, verificamos que ambas foram eficientes, com perdas

dos padrões adicionados inferiores a 15 %. Assim, optamos por utilizar a metodologia de extração com diclorometano, por ser mais rápida e de menor custo.

Para a construção das curvas de calibração dos dois compostos, primeiramente foram feitas extrações de toda a MEL e AFMK basais dos plasmas, adicionando-se três vezes com o mesmo volume de diclorometano ao plasma. Toda a fase de diclorometano foi então descartada e o plasma considerado como “branco”, ou seja, livre de concentrações de basais de MEL e AFMK. Posteriormente, 1 pmol da MELD₃ e 1 pmol do AFMKD₃ foram adicionados a 5 alíquotas de 1 mL deste plasma branco. Então, padrões de MEL e AFMK não marcados foram adicionados a cada uma das alíquotas, nas seguintes concentrações (respectivamente para MEL e AFMK):

alíquota A) – 0,1 e 0,5 pmol;

alíquota B) – 0,5 e 1 pmol;

alíquota C) – 1 e 3 pmol;

alíquota D) – 3 e 5 pmol;

alíquota E) – 5 e 10 pmol.

Uma outra alíquota de 1 mL de plasma branco foi utilizada como o branco de amostra para se verificar a possível persistência de MEL e AFMK basais após a extração, sendo que nada foi adicionado a esta fração. Após a preparação dos plasmas com os respectivos padrões, estes foram extraídos com diclorometano, como descrito acima (extração *a*).

As amostras foram analisadas por HPLC acoplado a espectrometria de massas no módulo *electrospray* positivo, utilizando a técnica denominada de “Multiple Reaction Monitoring”, onde as transições de $m/z = 233 - 174$ e $236 - 174$ (fragmentação da MEL e MELD₃, respectivamente, na câmara de colisão, perdendo o grupo *N*-acetil), e $m/z = 265 -$

178 e 268 – 178 (fragmentação do AFMK e AFMKD₃, respectivamente, na câmara de colisão perdendo os grupos *N*-acetil e *N*-formil), foram monitoradas simultaneamente (o esquema 7.2. mostra ilustrativamente como funciona a técnica de MRM). As condições foram as mesmas descritas anteriormente, com a energia de colisão do segundo quadrupolo (câmara de colisão) ajustada para 15 V.

Para este estudo, as condições de HPLC/ESI/MS foram as mesmas descritas anteriormente, com um *splitter* conectado entre o HPLC e o espectrômetro, permitindo a entrada de um fluxo de 0,25 mL/min no espectrômetro de massas.

Na figura 7.25., temos as curvas de calibração obtidas para a MEL e para o AFMK, utilizando estas transições, indicando que todos os compostos foram detectados com alta especificidade e sensibilidade.

Por fim, na figura 7.26. temos o perfil cromatográfico da injeção de uma extração do plasma branco (branco de amostra) e de uma amostra extraída com diclorometano, com os padrões internos marcados adicionados antes da extração.

Esquema 7.2. – Esquema ilustrativo da técnica de detecção de compostos por “MRM”. As amostras (neste caso a melatonina) saem do HPLC e entram no espectrômetro de massas, sendo que no primeiro quadrupolo (MS1) seleciona-se a massa do íon molecular do composto ($m/z = 233$ para a melatonina), a qual então passa para o segundo quadrupolo (câmara de colisão) gerando diversos fragmentos. Aqueles mais intensos (no caso da melatonina $m/z = 174$) são então selecionados através do terceiro quadrupolo (MS2), e então são detectados.

Figura 7.25. – Curva de calibração do AFMK e da MEL.

Figura 7.26. – Injeção de 100 μ L da extração com diclorometano do plasma humano contendo os padrões internos MELD₃ e AFMKD₃ nas concentrações de 1 pmol.

8. Perspectivas futuras

Este trabalho fornece informações importantes a respeito de diversas respostas bioquímicas de moluscos bivalves frente a diferentes tipos de estresse ambiental, as quais são úteis no estabelecimento de futuros estudos de monitoramento da contaminação do ambiente aquático no Brasil. Seguindo as metodologias e conhecimentos adquiridos ao longo do desenvolvimento deste trabalho, pode-se desenvolver estudos correlacionando níveis de lesões em biomoléculas e de sistemas antioxidantes, com novas proteínas de expressão alterada em resposta a contaminantes, as quais deverão ser isoladas e identificadas por gel de 2 dimensões acoplado a detecção por espectrometria de massas.

Estudos de monitoramento ambiental requerem uma grande quantidade de amostras, coletadas nos diferentes pontos com suspeita de contaminação. Por isso, pode-se estudar meios de se otimizar as análises feitas de modo a torna-las mais rápidas e eficientes, testando, por exemplo, novas condições cromatográficas e a automação dos métodos de ensaios enzimáticos em microplacas, permitindo a análise de grandes quantidades de amostras em um período mais curto e de modo mais eficiente.

Com respeito aos estudos sobre biomarcadores de poluição e sobre os efeitos antioxidantes da melatonina, pode-se desenvolver alguns outros estudos sobre: i) flutuações nos níveis de melatonina em peixes expostos a contaminantes; ii) estudar formação e detecção de produtos oxidados da melatonina no plasma destes mesmos peixes em resposta à contaminação ambiental, utilizando a metodologia por HPLC/MS desenvolvida neste trabalho.

Este trabalho contribui aos estudos de modificações bioquímicas em organismos aquáticos, ligadas ao monitoramento de alterações ambientais marinhas.

9. Referências bibliográficas

- ABE M, REITER RJ, ORHII P, HARA M, POEGGELER B & BARLOW-WALDEN LR (1994) Inhibitory effect of melatonin on cataract formation in newborn rats: Evidence for an antioxidative effect for melatoinn. *J. Pineal Res.* 17, 94-100.
- AKBERALI HB & TRUEMAN ER (1982) Effects of environmental stress on marine bivalve molluscs. *Advanc. Mar. Biol.* 22, 101-198.
- AKCHA F, RUIZ S, ZAMPIERON C, VENIER P, BURGEOT T, CADET J & NARBONE JF (2000) Benzo[a]pyrene-induced DNA damage in *Mytillus galloprovincialis*: measurement of bulky DNA adducts and DNA oxidative damage in terms of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine formation. *Biomarkers* 5, 355-367.
- ALCARAZ-ZUBELDIA M, ROJAS P, BOLL C & RIOS C (2001) Neuroprotective effect of acute and chronic administration of cooper (II) sulfate against MPP⁺ neurotoxicity in mice. *Neurochem. Res.* 26(1), 59-64.
- ALCUTT F & PINTO JT (1994) Glutathione concentrations in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, following laboratory exposure to lead (a potential model system for evaluating exposure to carcinogens and toxins). *Comp. Biochem. Physiol.* 107C, 347-352.
- ALMEIDA EA, DAFRÉ AL & BAINY ACD. (1998) Antioxidant defenses in the intertidal mussel *Perna perna*. ***IX Biennial Meeting International Society for Free Radical Research. São Paulo,SP.***
- AMIARDTRIQUET C, ALTMAN S, AMIARD JC, BALLANDUFRANCAIS C, BAUMARD P, BUDZINSKI H, CROUZET C, GARRIQUES P, HIS E, JEANTET AY, MENASRIA R, MORA P, MOUNEYRAQ C, NARBONE JF, PAVILLON JF (1998) Fate and effects of micropollutants in the Gironde estuary, France – a multidisciplinary approach. *Hidrobiologia* 374, 259-279.

- ANDRISANO V, BERTUCCI C, BATTAGLIA V & CAVRINI V (2000) Photostability of drugs: photodegradation of melatonin and its determination in commercial formulations. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 23, 15-23.
- ARAI H, MOHRI S, SUZUKI T, TAKAMA K, TERAOKA J (1997) Coulometric electrochemical detection of phospholipid hydroperoxides by high-performance liquid chromatography. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61(1), 191-193.
- BAINY ACD (1996) Oxidative stress as a biomarker of polluted aquatic sites **Physiology of the fishes of the Amazon** (Val AL, Almeida-Val VMF & Randall DJ, eds.) 331-335.
- BAYNE BL (1989) Measuring the biological effects of pollution: the mussel watch approach. *Water Sci. Tech.* 21, 1089-1100.
- BELL RP & McDOUGALL AO (1960) Hydration equilibria of some aldehydes and ketones. *Trans. Faraday Soc.* 56, 1281-1285.
- BENDER ML & THOMAS RJ (1961) The concurrent and alkaline hydrolysis and isotopic oxygen exchange of a series of *p*-substituted acetanilides. *J. Am. Chem. Soc.* 83, 4183-4189.
- BEUTLER E (1975) **Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods**. Grune & Stratton, New York, 342pp.
- BINKLEY S (1993) Structures and molecules involved in generation and regulation of biological rhythms in vertebrates and invertebrates. *Experientia* 49, 648-653.
- BOFFI AV (1979) **Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico**. São Paulo, FAPESP-HUCITEC, 198 pp.
- BREEN AP & MURPHY JA (1995) Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Rad. Biol. Med.* 18(6), 1033-1077.

- BROWNE RJ & OGRYSLO EA (1964) Chemiluminescence from reaction of chlorine with aqueous hydrogen peroxide. *P. Chem. Soc. London*, 117.
- BUCHELI TD & FENT K (1995) Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 25, 201-268.
- BURGEOT T, BOCQUÉNÉ G, POORTE C, DIMEET J, SANTELLA RM, GARCIA DE LA PARRA LM, PFHOL-LESZKOWICSC A, RAOUX C & GALGANI F (1996) Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 131, 125-141.
- CADET J, DOUKI T, FRELON S, GASPARUTTO D, RAVANAT JL, SAUVAIGO S, MARTINEZ GR, MEDEIROS MHG & DI MASCIO P (2002) Oxidative damage to DNA: formation and measurement. *In: Proceedings of 11th conference SFRRI* (PASQUIER C, ed.), Paris, Monduzzi Editore, S.P.A., Bologna, Italy, 129-135
- CAJARAVILLE MP, BEBIANO MJ, BLASCO J, PORTE C, SARASQUETE C & VIARENGO A (2000) The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Tot. Environ.* 247, 295-311.
- CANCIO I, BABE A & CAJARAVILLE MP (1999) Seasonal variation of peroxisomal enzyme activities and peroxisomal structures in *Mytilus galloprovincialis* and its relationship with the lipid content. *Comp. Biochem. Physiol. C* 123, 138-144.
- CANCIO I & CAJARAVILLE MP (1999) Seasonal variation of xantine oxidoreductase activity in the digestive gland cells of the mussel *Mytillus galloprovincialis*: A biochemical, histochemical and immunochemical study. *Biol. Cell* 91, 606-615.

- CANESI L, CIACCI C, PICCOLI G, STOCCHI V, VIARENGO A & GALLO G (1998) In vitro and in vivo effects of heavy metals on mussel digestive gland hexokinase activity: the role of glutathione. *Comp. Biochem. Physiol.* 120C, 261-268.
- CANOVA S, DEGAN P, PETERS LD, LIVINGSTONE DR, VOLTAN R & VENIER P (1998) Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. *Mutat. Res.* 399, 17-30.
- CASTRO EM, URPI OP, MADRIZ EZ, QUESADA RQ & MONTOYA JÁ (1985) Tasa de filtración del ostión de manglar (*Crassostrea rhizophorae*, Guilding 1828), a diferentes salinidades y temperaturas. *Revista de Biología Tropical* 33(1), 77-79.
- CHEESEMAN KH (1993) Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Molec. Aspects Med.* 14, 191-197.
- COHN M & URBY HC (1938) Oxygen exchange reactions of organic compounds and water. *J. Am. Chem. Soc.* 60, 679-687.
- COLLIN JP, VOISIN P, FALCÓN J, FAURE JP, BRISSON P & DEFAYE JR (1989) Pineal transducers in the course of evolution: molecular organization, rhythmic metabolic activity and role. *Arch. Histol. Cytol.* 52, 441-449.
- CRUZ R & JIMÉNEZ J (1994) **Moluscos asociados a las áreas de manglar de la Costa Pacífica de América Central**. Editorial Fundación UNA. 180 p.
- DAILIANIS S, DOMOUHTSIDOU GP, RAFTOPOULOU E, KALOYIANNE M & DIMITRIADIS VK (2003) Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.* 56, 443-470.

- DANIELS WMU, REITER RJ, MELCHIORRI D, SEWERYNEK E, PABLOS MI & ORTIZ GG (1995) Melatonin counteracts lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride but does not restore glucose-6-phosphatase activity. *J. Pineal Res.* 19, 1-6.
- DAVIES KJA (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61, 1-31.
- DIETZ TH, WILSON JM & SILVERMAN H (1992) Changes in monoamine transmitter concentration in freshwater mussel tissues. *J. Exp. Zool.* 261(3), 355-358.
- DI MASCIO P, MEDEIROS MHG, BECHARA EJH & CATALANI LH (1995) Singlet molecular oxygen: generation, reactivity and biological effects. *Ciência e Cultura* 47, 297-311.
- DI MASCIO P & SIES H (1989) Quantification of singlet oxygen generated by thermolysis of 3,3'-(1,4-naphthydilene)dipropionate. Monomol and dimol photoemission and effects of 1,4-diazabicyclo[2.2.2.]octane. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 2909-2914.
- DOYOTTE A, COSSU C, JACQUIN MC, BABUT M & VASSEUR P (1997) Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tunmidus*. *Aquat. Toxicol.* 39, 93-110.
- ELLMAN GL, COURTNEY KO, ANDRESS V & FEATHERSTONE RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- EPE B (1991) Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem. Biol. Interact.* 80, 239-260.
- ESTERBAUER H (1984) Lipid peroxidation products: formation, chemical properties and biological activities. In: **Free Radicals in Liver Injury** (Poli G, Cheeseman KH, Dianzani MU, Slater TF, eds). Oxford: IRL Press, 29-47.
- FALCÓN J (1998) Cellular circadian clocks in the pineal. *Progress Neurobiol.* 58, 121-162.

- FARBER JL, KYLE ME & COLEMAN JB (1990) Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest.* 62, 670-678.
- FANG X, JIN F, JIN H & VON SONNTAG C (1998) Reaction of the superoxide radical with the N-centered radical derived from *N*-acetyltryptophan methyl ester. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 259-263.
- FIALA ES, CONAWAY CC & MATHIS JE (1999) Oxidative DNA and RNA damage in the livers of sprague-dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane. *Cancer Res.* 49, 5518-5522.
- FONG PP, DUNCAN J & RAM JL (1994) Inhibition and sex specific induction of spawning by serotonergic ligands in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Experientia* 50(5), 506-509.
- FOOTE CS (1991) Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* 54(5), 659.
- FUJIMOTO K, NEFF WE & FRANKEL EN (1984) The reaction of DNA with lipid oxidation products, metals and reducing agents. *Biochim. Biophys. Acta* 795, 100-107
- FURTADO VV, BÍCEGO MC, WEBER RR (1987). Modelo de dispersão de óleo na região do Canal de São Sebastião. In: Simpósio sobre Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira: síntese dos conhecimentos, Cananéia, São Paulo, Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 2:371-388 (Publicação ACIESP, N 54-II).
- GEDEON Y, RAMESH GT, WELLMAN PJ & JADHAV AL (2001) changes in mesocorticolimbic dopamine and D1/D2 receptor levels after low level lead exposure: a time course study. *Toxicol. Let.* 123, 217-226.

- GERET F, SERAFIN A, BARREIRA L & BEBIANO MJ (2002) Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Mar. Environ. Res.* 54, 413-417.
- GIES A (1986) Serotonin and dopamine as regulators of adenylate cyclase and relaxation in a smooth muscle of the mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 84(1), 61-66.
- GUILHERMINO L, LACERDA MN, NOGUEIRA AJA & SOARES AMVM (2000) In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. *Sci. Tot. Environ.* 247, 137-141.
- GUILL TS, TEWARI H & PANDE J (1991) In vivo and in vitro effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchoni* (rosy barb). *Comp. Biochem. Physiol.* 100(C), 501-505.
- GUTTERIDGE JMC & HALLIWELL B (1990) The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* 15, 129-135.
- HALLIWELL B & GUTTERIDGE JMC (1999) **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, London, 936 pp.
- HARTHE C, CLAUDY D, DECHAUD H, VIVIEN-ROELS B, PEVET P & CLAUSTRAT B (2003) Radioimmunoassay of *N*¹-acetyl-*N*²-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK): a melatonin oxidative metabolite. *Life Sci.* 73(2), 1587-1597.
- HARUMI T & MATSUSHIMA S (2000) Separation and assay methods for melatonin and its precursors. *J. Chromat. B.* 747, 95-110.
- HARVEY JS & PARRY JM (1998) The analysis of DNA adduct formation, removal and persistence in the common mussel *Mytilus edulis* exposed to 4-nitroquinoline 1-oxide. *Mutat. Res.* 399(1), 31-42.

- HEBBEL RP (1986) Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *J. Lab. Clin. Med.* 107, 401-404.
- HELBOCK HJ, BECKMAN KB, SHIGENAGA MK, WALTER PB, WOODAL AA, YEO HC & AMES BN (1998) DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 288-293.
- HERMES-LIMA M & STOREY KB (1995) Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am. J. Physiol.* 268, R1386-R1393.
- HIRATA F & HAYAISHI O (1974) *In vitro* and *in vivo* formation of two new metabolites of melatonin. *J. Biol. Chem.* 249, 1311-1313.
- HOLTZ-WAGENBLATT A & SHALLOWAY D (1993) Gap junctional communication and neoplastic transformation. *Crit. Rev. Oncogenesis* 4, 541-558.
- HONG Y-L, YEH S-L, CHANG C-Y & HU M-L (2000) Total plasma malondialdehyde levels in 16 taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clin. Biochem.* 33(8), 619-625.
- IBGE Projeto Gerenciamento Costeiro: Diagnóstico ambiental do litoral de Santa Catarina.** IBGE - Secretaria de Estado do Desenvolvimento Econômico e Integração ao MERCOSUL-SDE/SC. 165pp. 1997.
- INOUE K, MATSUURA T & SAITO I (1982) Mechanism of dye-sensitized photooxidation of tryptophan, tryptamine, and their derivatives. Singlet oxygen process in competition with type I process. *Bull. Chem. Soc. Jpn* 55, 2959-2964.
- JAMES B, POLHILL V & DIMOCK RV (1996) Effects of temperature and pO₂ on the heart rate of juvenile and adult freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 144A(2), 135-141.

- JONES DJ (1986) Renal metabolism during normoxia, hypoxia and ischemic injury. *Ann. Rev. Physiol.* 48, 33-50.
- KASAI H (1997) Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8OHdG, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat. Res.* 387(3), 147-163.
- KEELING PL & SMITH LL (1982) Relevance of NADPH depletion and mixed disulphide formation in rat lung to the mechanism of cell damage following paraquat administration. *Biochem. Pharmacol.* 31, 3243-3249.
- KEEN JH, HABIG WH & JAKOBY WB (1976) Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183-6188.
- KEHRER JM (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanism of toxicity. *Toxicology* 149, 43-50.
- KEMENES G (1997) *In vivo* neuropharmacological and *in vitro* laser ablation techniques as tools in the analysis of neuronal circuits underlying behaviour in a molluscan model system. *Gen. Pharmacol.* 29(1), 7-15.
- KEMENES G, HIRIPI L & BEMJAMIN PR (1990) Behavioral and biochemical changes in the feeding system of *Lymacea* induced by the dopamine and serotonin neurotoxins 6-hydroxydopamine and 5,6-dihydroxytryptamine. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 329, 243-255.
- KHAN AU & KASHA M (1963) Red luminescence of molecular oxygen in aqueous solution. *J. Chem. Phys.* 39, 2105-2109.
- KHAN AU & KASHA M (1969) **Correction**, *J. Chem. Phys.* 40, 605.
- KLAPPENBACH MA (1965) Lista preliminar de los Mytilidae Brasileños con claves para su determinación y notas sobre su distribución. *An. Acad. Bras. Ciên.* 37, 327-352.

- KOHLER G & LINDL T (1980) Effect of 5-hydroxytryptamine, dopamine, and acetylcholine on accumulation of cyclic AMP and cyclic GMP in the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis* L. *Pflügers Arch.* 383(3), 257-262.
- KOLÁR J, MACHÁKOVA I, EDER J, PRINSEN E, VAN DONGEN W, VAN ONCKELEN H & ILLNEROVÁ H (1997) Melatonin: occurrence and daily rhythm in *Chenopodium rubrum*. *Phytochemistry.* 44(8), 1407-1413.
- KRISHNAKUMAR PK, CASILLAS E & VARANASI U (1997) Cytochemical responses in the digestive tissue of *Mytilus edulis* complex exposed to microencapsulated PAHs or PCBs. *Comp. Biochem. Physiol.* 118C, 11-18.
- KUJIK FJGM, HANDELMAN GJ & DRATZ E.A. (1985) Consecutive action of phospholipase A2 and glutathione peroxidase is required for reduction of phospholipid hydroperoxides and provides a convenient method to determine peroxide values in membranes. *J. Free. Radic. Biol. Med.* 1, 421-427.
- LAGANÀ A, MARINO A, FAGO G, PARDO-MARTINEZ B & BIZZARRI M (1995) Sensitive assay for melatonin in human serum by liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 316, 377-385.
- LARADE K & STOREY KB (2002) A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates. *In: Cell and Molecular Responses to Stress. Vol 3: Sensing, Signaling, and Cell Adaptation* (STOREY KB & STOREY JM, eds.). Elsevier Press, Amsterdã.
- LEMAIRE P & LIVINGSTONE DR (1993) Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. *Trends Comparat. Biochem. Physiol.* 1119-1120.

- LIVINGSTONE DR (1993) Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 57, 195-211.
- LIVINGSTONE DR (2001) Contaminant-stimulated reactive oxygen production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42(8), 656-666.
- LÓPEZ-BURILLO S, TAN DX, RODRÍGUEZ-GALLEGO V, MANCHESTER LC, MAYO JC, SAINZ RM & REITER RJ (2003) Melatonin and its derivatives cyclic 3-hydroxymelatonin, N^1 -acetyl- N^2 -formyl-5-methoxykynuramine, and 6-methoxymelatonin reduce oxidative DNA damage by Fenton reagents. *J. Pineal Res.* 34(3), 178-184.
- LOUREIRO APM, DI MASCIO P, GOMES OF & MEDEIROS MHG (2000) *trans,trans*-2,4-decadienal-induced 1, N^2 -Etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 601-609.
- LOUREIRO APM, MARQUES SA, GARCIA CCM, DI MASCIO P & MEDEIROS MHG (2002) Development of an on-line liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry system to quantitatively determine 1, N^2 -etheno-2'-deoxyguanosine in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1302 - 1308.
- LU AYH, JUNK KW & COON M (1969) Resolution of the cytochrome P-450-containing omega-hydroxylation system of liver microsomes into three components. *J. Biol. Chem.* 244, 3714-3721.
- LU J, LAU C, LEE MK & KAI M (2001) Simple and convenient chemiluminescence method for the determination of melatonin. *Anal. Chim. Acta* 455, 193-198.

- MAGALHÃES ARM (1998) Efeito da parasitose por *Trematoda bucephalidae* na reprodução, composição bioquímica e índice de condição de mexilhões *Perna perna*. Tese de doutorado. Instituto de Biociências, USP, São Paulo, Brasil.
- MAIORINO M, GREGOLIN C, URSINI F (1990) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 186, 448-457.
- MALLINS DC & HAIMANOT R (1990) 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine, 9-hydroxyguanine and 8-hydroxyadenine in DNA from neoplastic liver of English sole exposed to carcinogens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 614-619.
- MALLINS DC & GUNSELMAN SJ (1994) Fourier-transform infrared spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry reveal a remarkable degree of structural damage in the DNA of wild fish exposed to toxic chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 13038-13041.
- MARSDEN ID & WEATHERHEAD MA (1998) Effects of aerial exposure on oxygen consumption by the New Zealand mussel *Perna canaliculus* (Gmelin, 1791) from an intertidal habitat. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 230, 15-29.
- MARSHAL KA, REITER RJ, POEGGELER B, ARUOMA OI & HALLIWELL B (1996) Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Rad. Biol. Med.* 21(3), 307-315.
- MARTINEZ GR, MEDEIROS MHG, RAVANAT JR, CADET J & DI MASCIO P (2002) ¹⁸O-labeled singlet oxygen as a tool for mechanistic studies 8-oxo-7,8-dihydroguanine oxidative damage: detection of spiroiminodihydantoin, imidazolone, and oxazolone derivatives. *Biol. Chem.* 383(3-4), 607-617.

- MARTINEZ GR, RAVANAT JL, MEDEIROS MGH, CADET J & DI MASCIO P (2000) Synthesis of a naphthalene endoperoxide as a source of ^{18}O -labeled singlet oxygen for mechanistic studies. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 10212-10213.
- MARTIN JP & LOGSDON (1987) The role of oxygen radicals in dye-mediated photodynamic effects in *E. coli*. *B. J. Biol. Chem.* 262, 7213-7221.
- MARTSH JW, CHIPMAN JK & LIVINGSTONE DR (1993) Formation of DNA adducts following laboratory exposure of the mussel, *Mytilus edulis*, to xenobiotics. *Sci. Total Environ.* 208, 567 - 572.
- MATOS HR, CAPELOZZI VL, GOMES OF, DI MASCIO P & MEDEIROS MGH (2001) Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitrilotriacetate. *Arch. Biochem. Biophys.* 396, 171-177.
- MATSUMOTO T, OSADA M, OSAWA Y & MORI K (1997) Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation. *Comp. Biochem. Physiol.* 118B, 811-817.
- MATUSZAK Z, RESZKA KJ & CHIGNELL CF (1997) Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations. *Free Rad, Biol. Med.* 23(3), 367-372.
- McCORD JM & FRIDOVICH I (1969) Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- McKEOWN E & WATERS WA (1964) Chemi-luminescence as a diagnostic feature of heterolytic reactions which produce oxygen. **Nature** 4949, 1063.
- MELCHIORRI D, REITER RJ, ATTIA AM, HARA M, BURGOS A & NISTICO G (1995) Potent protective effect of melatonin on *in vivo* paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sci.* 56, 83-85.

- MDC/MMA Macrodiagnóstico da Zona Costeira do Brasil na Escala da União. Ministério do Meio Ambiente dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Sony Music-CD Room**. 1996.
- MITCHELMORE CL, CHIPMAN JK, GARCIA-MARTINEZ P, LEMAIRE P, PETERS LD & LIVINGSTONE DR (1996) Normal status of hepatic 7-ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) activity, antioxidant enzymes and DNA oxidation in turbot (*Scophthalmus maximus*) and other flatfish species following exposure to nitroaromatic compounds. *Mar. Environ. Res.* 42, 329 - 333.
- MOREIRA FM (1995) Estudo morfológico e quantitativo dos hemócitos do mexilhão *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). Trabalho de conclusão do curso de Ciências Biológicas (UFSC). 58 pp.
- MUNEOKA Y, FUJISAWA Y, MATSUURA M & IKEDA T (1991) Neurotransmitters and neuromodulators controlling the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 98(1), 105-114.
- MURAKAMI H, SANO M, TSUKIMURA T & YAMAZAKI A (1988) The relaxation induced by indole and nonindole 5-HT agonists in the molluscan smooth muscle. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 90(1), 249-255.
- NASCIMENTO IA, PEREIRA AS & SOUZA RC (1980) Determination of the optimum commercial size for the mangrove oyster (*Crassostrea rhizophorae*) in Todos os Santos Bay, Brazil. *Aquaculture* 20, 1-8.
- NAIR J (1999) Lipid peroxidation-induced etheno-DNA adducts in humans. *IARC Sci. Publ.* 150, 55-61.
- NAJIMI S, BOUHAIMI A, DAUBÈZE M, ZEKHINI A, PELLERIN J, NARBONNE JF & MOUKRIM A (1997) Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus edulis* as a

- biomarker of pollution in agadir marine bay (south of Moroco) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 901-908.
- NARBONE JF, DAUBÉZE M, CLÉRANDÉAU C & GARRIGUES P (1999) Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts. *Biomarkers.* 4, 415-424.
- NEMCSÓK J, HIRIPI L, PATOCSKAI M, SALÁNSKI J & KUFKSÁK O (1997) The effects of pesticides on monoaminergic system related to periodic activity of mussels (*Anodonta cugnea*). *Gen. Pharmac.* 29, 79-83.
- NICOLAY S, WILLEMS J, ZWIJSEN A, MECHELEN EL & SLEGERS H (1996) Cyclic AMP-induced differentiation increases the synthesis of extracellular superoxide dismutase in rat C6 glioma. *Free. Rad. Biol. Med.* 21, 481-486.
- NOAA TECHNICAL MEMORANDUM International Mussel Watch project: initial implementation phase final report. 63 pp. 1995.
- ONO JK, HAMPTON JD & KOCH RA (1992) Immunohistochemical localization and radioenzymatic measurements of serotonin (5-hydroxytryptamine) in hearts of *Aplysia* and several bivalve mollusks. *Cell Tissue Res.* 269, 421-430.
- PAWLAK D, TANKIEWICS A, MATYS T & BUCZCO W (2003) Peripheral distribution of kynurenine metabolites and activity of kynurenine pathway enzymes in renal failure. *J. Physiol. Pharmacol.* 54(2), 175-189.
- PETERSON GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346-356.
- PRAKASH NT & RAO KSJ (1995) Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalves *Perna viridis* during heavy metal exposure. *Mol. Cell. Biochem.* 146, 107-113.

- RADEMACHERD, STEINPREIS RE & WEBER DN (2001) Short term exposure to dietary Pb and/or DMSA affects dopamine and dopamine metabolite levels in the medulla, optic tectum, and cerebellum of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pharm. Biochem. Behav.* 70, 199-207.
- RAM JL, MOORE D, PUTCHAKAYALA AA, MA D & CROLL RP (1999) Serotonergic responses of the siphons and adjacent mantle tissue of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 124, 211-220.
- RAVANAT JL & CADET J (1995) Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products. *J. Chem. Res. Toxicol.* 8, 379-388.
- REITER RJ (1998) Cytoprotective properties of melatonin: Presumed association with oxidative damage and aging. *Nutrition* 14, 691-696.
- REITER RJ, TAN DX, OSUNA C & GITTO E (2000) Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J. Biom. Sci.* 7, 444-458.
- RIBERA D, NARBONE JF, MICHEL X, LIVINGSTONE DR & O'HARA S (1991) Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comp. Biochem. Physiol.* 100, 177-181.
- RIOS EC (1985) **Seashells of Brazil**. Rio Grande, RS, 2ª Edição, Fund. Univ. do Rio Grande. 431 p.
- RODRÍGUEZ-ARIZA A, ALHAMA J, DÍAZ-MÉNDEEZ FM, LÓPEZ-BAREA J (1999) Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of *Sparus aurata* fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution. *Mutat. Res.* 438, 97-107.
- RODRÍGUEZ-ARIZA A, MARTINEZ-LARA E, PASCUAL P, PEDRAJAS JR, ABRIL N, DORADO G, TORÍBIO F, BÁRCENA JÁ, PEINADO J, PUEYO C & LÓPEZ-

- BAREA J (1993) Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *Sci Tot Environ Suppl Pt 1*:109-116.
- SAINT-DENIS M, NARBONE JF, ARNAUD C & RIBERA D (2001) Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of lead acetate. *Soil Biol. Biochem.* 33, 395-404.
- SALÁNKI J (1971) Control of periodicity by nonoscillating external factors in Pelecypoda. *J. Interdiscip. Cycle Res.* 2, 33-41.
- SANDEE B, SCHIPPER CA & EARTMAN RHM (1996) High-performance liquid chromatography determination of the iminoacids (opines) *meso*-alanopine and D-strombine in muscle extract of invertebrates. *J. Chromat. B* 685, 176-180.
- SCHNEIDER JE, PRICE S, MAIDT L, GUTTERIDGE JMC & FLOYD R (1990) Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy 2'-deoxiguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage. *Nucleic acid Res.* 18, 631-635.
- SEGÖRBÄCK D (1983) Alkylation of DNA and hemoglobin in the mouse following exposure to ethene and ethene oxide. *Chem. Biol. Interact.*, 45, 139-151.
- SEVANIAN A, MUAKASSAH-KELLY SF & MONTESTRUQUE S (1983) The influence of phospholipase A2 and glutathione peroxidase on the elimination of membrane lipid peroxides. *Arch. Biochem. Biophys.* 223, 441-452.
- SIES H (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215, 213-219.
- SIES H, KOCH OR, MARTINO E & BOVERIS A (1979) Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. *FEBS Letters* 103, 287-290.
- SODUM RS & CHUNG FL (1988) 1,N²-ethenodeoxyguanosine as a potential marker for DNA adduct formation by trans-4-hydroxy-2-nonenal. *Cancer Res.*, 48, 320-323.

- SOLÉ M, PORTE C & ALBAIGÉS J (1995) Seasonal variation in mixed function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 157-164.
- SOLÉ M, PORTE C & ALBAIGÉS J (1995) The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels. *The Sci. Tot. Environ.* 159, 147-153.
- STEFFANI CN & BRANCHI GM (2003) Growth rate, condition, and shell shape of *Mytilus galloprovincialis*: responses to wave exposure. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 246, 197-209.
- STEGEMAN JJ, BROWER M, DI GIULIO RT, FÖRLIN L, FOWLER BA, SANDERS BM & VAN HELD PA (1992) **Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect in biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress** (HUGGET RJ, KIMERLE RA, MEHRLE PP & BERGMAN HL, eds). Lewis Publishers. 235-335.
- STEGEMAN JJ & HAHN ME (1994) Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: **Aquatic toxicology: molecular, biochemical and cellular perspectives** (MALINS DC & OSTRANDER GK, eds.). Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, pp. 87-206.
- STEINERT AS, MONTEE RS & SASTRE MP (1998) Influence of sunlight on DNA damage in mussels exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar. Env. Res.* 1-5, 355-358.
- STONE T (2001) Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Prog. Neurobiol.* 64, 185-218.
- STOREY KB (1996) Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29(12), 1715-1733.

- TADDEI-FERRETI C & MUSIO C (2000) Photobehaviour of Hydra (Cnidaria, Hydrozoa) and correlated mechanisms: a case of extraocular photosensitivity. *J. Photochem. Photobiol.* 55, 88-101.
- TAN DX, MANCHESTER LC, REITER RJ, PLUMMER BF, HARDIES LJ, WEINTRAUB ST, VIJAYALAXMI & SHEPHERD AMM (1998) A novel melatoinn metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of *in vivo* hydroxyl radical generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 614-620.
- TAN DX, MANCHESTER LC, REITER RJ, PLUMMER BF, LIMSON J, WEINTRAUB ST & QI W (2000) Melatoinn directly scavenges hydrogen peroxyde: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Rad. Biol. Med.* 29(11), 1177-1185)
- TAN DX, MANCHESTER LC, BURKHARDT S, (2001) *N*1-acetyl-*N*2-formyl-5-methokykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, function as a potent antioxidant. *FASEB J.* 15(2), 2294-2296.
- TAN KH, MEYER DJ, COLES B, GILLIES N & KETTERER B (1987) Detoxification of peroxidized DNA by glutathione transferases. *Biochem. Soc. Trans.* 15, 628-629.
- TAN DX, POEGGELER B, REITER RJ, MANCHESTER LD & BARLOW-WALDEN LR (1993) The pineal hormone melatonin inhibits DNA adducts formation induced by the chemical carcinogen safrole. *Cancer Lett.* 70, 65-71.
- TERAO J, NAGAO A, PARK D-K & BOEY PL (1992) Lipid hydroperoxide assay for antioxidative activity of carotenoids. *Methods Enzymol.* 213, 192-205.
- TIMBREL JA (1998) Biomarkers in toxicology. *Toxicology* 129, 1-12.
- TORRE FR, SALIBIÁN A & FERRARI L (2000) Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterbone cadmium.

- TORRES MA, TESTA CP, GÁSPARI C, MASUTTI MB, PANITZ CMN, CURI-PEDROSA R, ALMEIDA EA, DI MASCIO P & FILHO DW (2002) Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Poll. Bull.* 44(9), 923-932.
- TSANG CW, CHAN CL, LI P & PANG SF (1996) Analysis of 5-methoxytryptamine at the femtomole level in the rat and quail brain by gas chromatography-electron-capture negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromat. B* 682, 185-194.
- TURJÁNSKI AG, LEONIK F, ESTRIN DA, ROSENSTEIN RE & DOCTOROVICH F (2000) Scavenging of NO by melatonin. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 10468-10469.
- URSINI F, MAIORINO M & GROGOLIN C (1985) The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 839, 62-70.
- VACA CE, WILHELM J & HARMS-RINGDAHL M (1988) Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutation Research.* 195, 137-149.
- van der OOST R, EYER J & VERMEULEN NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Env. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.
- VERSHININ A (1996) Carotenoids in mollusca: approaching the functions. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B, 63-71.
- VIARENGO A, CANESI L, PERTICA M & LIVINGSTONE D (1991) Seasonal variations in antioxidant defense enzymes and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol. C* 100, 187-190.
- VIARENGO A & CANESI L (1991) Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture* 94, 226-243.

- VIARENGO A, BURLANDO B, CAVALETTO M, MARCHI B, PONZANO E & BLASCO J (1999) Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. Physiol. Soc.* R1612-R1619.
- VIARENGO A, PONZANO E, DONDERO F & FABBRI R (1997) A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to mediterranean and antartic molluscs. *Mar. Env. Res.* 44, 69-84.
- WALKER CH, HOPKIN SP, SIBLY RM & PEAKALL DB (1996) (Eds.) **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis. Londres. 321pp.
- WANG L, HIRAYASU K, ISHIZAWA M & KOBAYASHI Y (1994) Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nucl. Ac. Res.* 22, 1774-1775.
- WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS). (1993) Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155. World Health Organization, Geneva.
- WILHELM-FILHO D, TRIBESS T, GÁSPARI C, CLÁUDIO FD, TORRES MA & MAGALHÃES ARM (2001) Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive glands of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture* 203, 149-158.
- WINTER CK, SEGALL HJ & HADDON WF (1986) Formation of cyclic adducts of deoxyguanosine with the aldehydes trans-4-hydroxy-2-hexenal and trans-4-hydroxy-nonenal in vitro. *Cancer Res.* 46, 5682-5686.
- WISEMAN H & HALLIWELL B (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 313, 17-29.

- XIMENES VF, CATALANI LH & CAMPA A (2001) Oxidation of melatonin and tryptophan by an HRP cycle involving compound III. *Biochem Biophys Res Commun.* 287(1), 130-134.
- YAGI K, KOMURA S, KOJIMA H, SUN Q, NAGATA N, OHISHI N & NASHIKIMI M (1996) Expression of human phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene for protection of host cells from lipid hydroperoxide-mediated injury. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 219, 486-491.
- YAMAMOTO Y & TAKAHASHI K (1993) Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides. *Arch. Biochem. Biophys.* 305, 541-545.
- ZANG LY, COSMA G, GARDNER H & VALLYATHAN V (1998) Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochim. Biophys. Acta* 1452, 469-477.

10. Anexos

Tabela 10.1. – Níveis de metais (ppm) encontrados nos locais referência e poluído.

Metal	Referência	Poluído
^{58}Ni	0.32 ± 0.054	0.94 ± 0.068 *
^{59}Co	0.295 ± 0.049	0.295 ± 0.007
^{51}V	2.725 ± 0.389	2.38 ± 0.141
^{55}Mn	60.0 ± 1.0	79.35 ± 1.63 *
^{47}Ti	10.35 ± 2.616	$7,87 \pm 0.891$
^{57}Fe	456 ± 66	533 ± 33
^{50}Cr	1.905 ± 0.332	1.775 ± 0.064
^{75}As	1.595 ± 0.078	1.61 ± 0.212
^{98}Mo	10.125 ± 1.124	9.35 ± 1.697
^{10}B	4.855 ± 0.007	4.84 ± 0.085
^{65}Cu	0.45 ± 0.02	3.39 ± 0.45 *
^{111}Cd	0.0073 ± 0.002	0.0255 ± 0.013 *
^{208}Pb	0.85 ± 0.042	0.755 ± 0.106
^{209}Bi	$0,00865$	0.00805

* indica diferença significativa.

Tabela 10.2. – Níveis de alguns parâmetros bioquímicos avaliados em brânquias e glândulas digestivas de mexilhões *P. perna* controle, expostos ao ar por 18 horas, e expostos ao ar por 18 horas seguido de re-submersão em água do mar por 1 hora. Enzimas expressas em U / mg proteína; Total GSH em nmol / g tecido.

Glândulas digestivas:

	Control	Exposed	Re-submersed
SOD	178.09 $\pm$ 47.87	138.47 $\pm$ 32.41	177.32 $\pm$ 69.74
CAT	11.44 $\pm$ 4.42	10.62 $\pm$ 3.80	9.74 $\pm$ 3.33
GPx	8.19 $\pm$ 3.26	6.85 $\pm$ 2.95	7.46 $\pm$ 3.80
GR	84.09 $\pm$ 15.15	85.87 $\pm$ 26.21	59.49 $\pm$ 21.46
G6PDH	50.80 $\pm$ 13.69	60.02 $\pm$ 17.31	48.08 $\pm$ 9.95
GST	129.55 $\pm$ 33.13	197.40 $\pm$ 49.35 *	181.49 $\pm$ 49.41 **
Total GSH	2.57 $\pm$ 0.52	2.64 $\pm$ 0.88	2.71 $\pm$ 0.65

* and ** indicates statistical difference compared to the control group (p<0.05). N=8.

Brânquias:

	Control	Exposed	Re-submersed
SOD	212.65 $\pm$ 57.13	168.14 $\pm$ 63.90	231.55 $\pm$ 49.07
CAT	3.11 $\pm$ 0.91	3.50 $\pm$ 3.02	3.49 $\pm$ 0.76
GPx	9.30 $\pm$ 7.56	8.21 $\pm$ 6.14	8.28 $\pm$ 3.80
GR	84.54 $\pm$ 21.00	137.45 $\pm$ 56.76	108.71 $\pm$ 52.66
G6PDH	116.35 $\pm$ 34.56	143.64 $\pm$ 31.00	98.77 $\pm$ 42.79
GST	630.67 $\pm$ 173.51	558.40 $\pm$ 203.33	616.10 $\pm$ 105.82
Total GSH	1.91 $\pm$ 0.49	2.13 $\pm$ 0.46	2.14 $\pm$ 0.57

N=8.

CURRICULUM VITAE

NOME: Eduardo Alves de Almeida

LOCAL E DATA DE NASCIMENTO: 13/11/1976, Ijuí, RS.

EDUCAÇÃO:

SEGUNDO GRAU: Colégio Industrial de Lages, SC e Colégio Posilages.

GRADUAÇÃO: Ciências Biológicas, no Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Artigos Publicados:

- Bairy, A.C.D.; **Almeida, E.A.**, Müller, I.C.; Ventura, E.C. & Medeiros, I.D. (2000) Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Mar. Environ. Res.* 50, 411-416.

- Torres, M.A.; Tribess, T.B.; Testa, C.P.; Gáspari, C.; Masuti, M.B.; Panitz, C.M.N.; Curi-Pedrosa, R.; **Almeida, E.A.**; Di Mascio, P. & Wilhelm-Filho, D. (2002) Oxidative Stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Poll. Bull.* 44, 923-932.

- **Almeida, E.A.**; Myamoto, S.; Martinez, G.R.; Medeiros, M.H.G.; Di Mascio, P. (2003) Direct evidence of singlet oxygen [$O_2 (^1\Delta_g)$] production in the reaction of acetonitrile with hydrogen peroxide in alkaline solutions. *Anal. Chim. Acta.* 482(1), 99-104.

- **Almeida, E.A.**; Marques, S.A.; Klitzke, C.F.; Bairy, A.C.D.; Medeiros, M.H.G.; Di Mascio, P. & Loureiro, A.P.M. (2003) DNA damage levels in the digestive glands and mantle tissues of the mussel *Perna perna*. *Comp. Biochem. Physiol. C*

- **Almeida, E.A.**; Martinez, G.R.M.; Klitzke, C.F.; Medeiros, M.H.G.; Di Mascio, P. (2003) Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen produces *N*¹-acetyl-*N*²-formyl-5-methoxykynurenine. *J. Pineal. Res.* 35(2), 131-137.

- **Almeida, E.A.**; Loureiro, A.P.M.; Bairy, A.C.D., Medeiros, M.H.G.; & Di Mascio, P. DNA and lipid damage in mussels from a contaminated site. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71, 270-275.

- **Almeida, E.A.**, Bainy, A.C.D., Medeiros, M.H.G. & Di Mascio, P. Effects of trace metal and air exposure on serotonin and dopamine levels of mussels *Perna perna*. *Mar. Poll. Bull.* 46, 1485-1490.

- Martinez, G.R.; Loureiro, A.P.M.; Marques, S.A.; Miyamoto, S.; Yamaguchi, L.F.; Onuki, J.; **Almeida, E.A.**; Garcia, C.C.M.; Barbosa, L.F.; Medeiros, M.H.G.; Di Mascio, P. Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutat. Res.* 544, 115-127.

- **Almeida, E.A.**; Gomes, O.F.; Bainy, A.C.D.; Medeiros, M.H.G.; Di Mascio, P. Lesões oxidativas no DNA de mexilhões *Perna perna* como indicadoras de estresse ambiental. *Biotemas*. (no prelo).

- **Almeida, E.A.**; Klitzke, C.F.; Medeiros, M.H.G.; Di Mascio, P. Synthesis of internal labeled standards of melatonin and its metabolite N^1 -acetyl- N^2 -formyl-5-methoxykynurenine for their quantification by an on-line liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry system. *J. Pineal Res.*

Artigos submetidos:

- **Almeida, E.A.**; Bainy, A.C.D.; Miyamoto, S.; Medeiros, M.H.G.; Di Mascio, P. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. *Mar. Pollut. Bull.*

- **Almeida, E.A.**, Bainy, A.C.D., Medeiros, M.H.G. & Di Mascio, P. Submetido. *In vivo* effects of metals on the cholinesterase activity from digestive gland of the mussel *Perna perna*. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*

Direct evidence of singlet molecular oxygen [$O_2 (^1\Delta_g)$] production in the reaction of acetonitrile with hydrogen peroxide in alkaline solutions

Eduardo A. Almeida, Sayuri Miyamoto, Glaucia R. Martinez,
Marisa H.G. Medeiros, Paolo Di Mascio*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26.077, 05513-970 São Paulo, SP, Brazil

Received 11 November 2002; received in revised form 23 December 2002; accepted 28 January 2003

Abstract

In this work, we report direct evidence of the formation of singlet molecular oxygen [$O_2 (^1\Delta_g)$] in the reaction of hydrogen peroxide (H_2O_2) with acetonitrile in alkaline solutions. The formation of $O_2 (^1\Delta_g)$ was characterized by: (i) the dimol light emission in the red spectral region (>610 nm) using a red-sensitive photomultiplier tube (PMT); (ii) the monomol light emission in the near-infrared region (1270 nm) with a newly available tube coupled to a monochromator; and (iii) the quenching effect of sodium azide. Direct spectral characterization of the near-infrared emission that attributes the emission to the transition of $O_2 (^1\Delta_g)$ to the triplet ground state ($O_2 (^3\Sigma_g^-)$) was done to unequivocally demonstrate the presence of $O_2 (^1\Delta_g)$. For comparison, $O_2 (^1\Delta_g)$ derived from the thermolysis of the endoperoxide of 1,4-dimethylnaphthalene or from the H_2O_2 /hypochlorite system were also monitored. The product of the reaction (acetamide) was also detected by mass spectrometry (MS). This evidence clearly demonstrates that the reaction of H_2O_2 with acetonitrile in alkaline solutions generates $O_2 (^1\Delta_g)$, confirming the mechanism proposed by McKeown and Waters.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Singlet oxygen; Hydrogen peroxide; Acetonitrile; Red light emission; Near-infrared emission

1. Introduction

According to the mechanism proposed by McKeown and Waters [1], singlet molecular oxygen ($O_2 (^1\Delta_g)$) could be generated by the reaction of alkaline hydrogen peroxide (H_2O_2) with nitriles. They could measure a low-level chemiluminescence (CL) with a small red component using a photomultiplier tube (PMT) and a red filter. Recently, Lu et al. [2] described in this journal a method for the determination of melatonin by the weak CL emitted when mixed with alkaline aqueous H_2O_2 and acetonitrile. According to their proposal, $O_2 (^1\Delta_g)$ could be generated by the reaction of the nitrile with alkaline H_2O_2 , which in turn reacted with melatonin causing CL emission. In an earlier paper, Lu's group [3] also postulated the generation of $O_2 (^1\Delta_g)$ from the reaction of alkaline H_2O_2 with acetonitrile, despite in both works there was no spectroscopic evidence to support the proposal.

The involvement of $O_2 (^1\Delta_g)$ with the red luminescence was elucidated by spectroscopic investigations using the reaction between H_2O_2 and hypochlorite by Khan and Kasha [4,5]. They observed the presence of

The involvement of $O_2 (^1\Delta_g)$ with the red luminescence was elucidated by spectroscopic investigations using the reaction between H_2O_2 and hypochlorite by Khan and Kasha [4,5]. They observed the presence of

* Corresponding author. Fax: +55-11-38155579.
E-mail address: pdmascio@iq.usp.br (P. Di Mascio).

two bands at 634 and 703 nm that were attributed to the simultaneous transitions of two molecules of oxygen in the $^1\Delta_g$ state by Arnold et al. [6]. This reaction was studied in detail by Cahill and Taube [7], which showed that the atoms forming O_2 ($^1\Delta_g$) came from H_2O_2 , and it was demonstrated that in alkaline solutions the yield of O_2 ($^1\Delta_g$) of this reaction is essentially 100% [8]. The transition of a single molecule of O_2 ($^1\Delta_g$) to the ground state occurs in the infrared region of the spectra at 1270 nm, and was investigated by Browne and Ogrysló [9] using the H_2O_2 /hypochlorite system. The lifetime of O_2 ($^1\Delta_g$) in solution is dependent of the nature of the solvent and is longer in a deuterated medium which is reflected directly in the intensity of luminescence [10,11]. Also, some substances are able to reduce the lifetime and CL of O_2 ($^1\Delta_g$), such as sodium azide [12] and histidine [13]. These effects together are commonly used to demonstrate the participation of O_2 ($^1\Delta_g$) in different systems [14].

We studied here the reaction of H_2O_2 with acetonitrile, using: (i) CL measurement of the dimol light emission in the red spectral region ($\lambda > 610$ nm) using a red-sensitive photomultiplier tube (reaction 1); (ii) CL measurement of the monomol light emission in the near-infrared region (1270 nm) with a new photomultiplier tube coupled to a monochromator (reaction 2); and (iii) the quenching effect of sodium azide. Also, the detection of the reaction product acetamide by mass spectrometry was performed to provide additional evidence of the mechanism for the formation of O_2 ($^1\Delta_g$) in this system.

2. Experimental

2.1. Dimol light emission of singlet oxygen

Low-level CL was measured with a single-photon counting system as described elsewhere [15,16], equipped with a red-sensitive photomultiplier tube cooled to -20°C by a thermoelectric cooler. The potential applied to the photomultiplier tube was

-1.2 kV. The phototube output was connected to an amplifier discriminator (Model 1121, Princeton Instruments, NJ) and to the computer for data acquisition. Selective light emission at wavelengths >610 nm was obtained using a cut-off filter (Melles Griot visible filters 03FCG101) placed between the cuvette and the PMT. Sample solutions were poured into a thermostat-equipped glass cuvette ($35 \text{ mm} \times 6 \text{ mm} \times 55 \text{ mm}$) with mirrored walls, with temperature adjusted to 40°C . Typically, 2 ml of 4 or 10 M H_2O_2 was injected into the solution contained in the cuvette (2 ml of pure acetonitrile, 1.8 ml of MilliQ water, and 0.2 ml of 1 M sodium carbonate) using a syringe injection pump (Syringe Pump Model 22, Harvard Apparatus, MA) at a flow rate of 0.7 ml min^{-1} .

2.2. Monomol light emission and spectral measurements of singlet oxygen in the near-infrared region

The O_2 ($^1\Delta_g$) monomol light emission spectrum was measured with a special photocounting apparatus developed in our laboratory, equipped with a monochromator capable of selecting emissions in the near-infrared region (800–1400 nm). The apparatus consists of a photomultiplier tube (RSS09 PMT, Hamamatsu Photonics KK, Shizuoka, Japan) cooled to -80°C with liquid nitrogen (S600 PHOTOCOOLTM, PC176TSCE005 cooler, Products for Research Inc., MA) to reduce the dark current. The power was provided by a high voltage dc power supply (Model C3360, Hamamatsu) and the applied potential was set to -1.5 kV. The light emitted from the sample was processed through a monochromator (M300, Edinburgh Analytical Instruments, Livingston) equipped with a diffraction grating capable of selecting wavelengths in the infrared region. A silicon filter was used (Spectrogon UK Ltd., Glenrothes, UK). The PMT output was connected to the computer and the signal acquired. The monochromator was controlled and the data acquired using the F-900 ver. 6.22 software program (Edinburgh Analytical Instruments). Typically, 3–5 scans in the range 1200–1350 nm were recorded and averaged to yield the spectrum. The assay was conducted in a thermostated quartz cuvette ($10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm} \times 30 \text{ mm}$) with continuous stirring (CUV-O-STIR[®], model 333, Hellma).

Monomol light emissions were also measured using the monochromator fixed at 1270 nm, using the equipment described. The experiments were typically carried out by adding 1 ml of acetonitrile, 0.9 ml of water and 0.1 ml of 1 M NaCO_3 or NaOH into a cuvette, and injecting 1 ml of 4 M H_2O_2 (1.33 M final concentration) after 50 s recording light out, put by means of a syringe injection pump at a flow rate of 0.7 ml min^{-1} .

2.3. LC/electrospray ionization mass spectrometry analysis of the acetamide product

Acetamide was determined by liquid chromatography (LC) electrospray ionization (ESI) mass spectrometry (MS) in the positive ion mode using a Platform II mass spectrometer (Micromass, Altrincham, UK). The source temperature of the mass spectrometer was kept at 100°C , and the flow rates of drying and nebulizing gas were optimized at 300 and 151 h^{-1} , respectively. The cone voltage was set to 20 V. The capillary potential and high electrode potential were set to 3.0 and 0.5 kV, respectively. Full scan data were acquired over a mass range of 40–100 m/z . The data were pro-

cessed by means of the Mass Lynx NT data system, version 3.20 (Micromass).

3. Results and discussion

3.1. Light emission detection of singlet oxygen

The measurement of CL originating from radiative transition of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ to its ground state is an important method for the detection and characterization of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$. Two types of CL derive from $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$: dimol emission and monomol emission. In the experiment, the mixture of H_2O_2 and acetonitrile in alkaline solutions produced a rapid increase in light emission in the wavelength range corresponding to monomol and dimol emission of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ (see reactions 1 and 2). As illustrated in Fig. 1, trace b, the injection of 2 ml of 10 M H_2O_2 into a 4 ml alkaline solution of 50% acetonitrile produced a strong emission in the red region ($\lambda > 610 \text{ nm}$). Using the special photocounting apparatus, the monomol light emission at 1270 nm was also observed in the reaction of alkaline H_2O_2 with acetonitrile, as shown in Fig. 2, trace b.

Fig. 1. Dimol light emission of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ generated in the reaction of alkaline H_2O_2 and acetonitrile: (a) control without H_2O_2 ; (b) injection of 2 ml of 10 M H_2O_2 (after 100 s) into 4 ml of 50% acetonitrile in water containing 0.2 ml of 1 M Na_2CO_3 ; (c) injection of sodium azide (to give a 71 mM final concentration into the cuvette) 100 s after the injection of the H_2O_2 , at the maximum signal as in (b). Injection rate was set to 0.7 ml min^{-1} .

Fig. 2. Monomol light emission of O_2 ($^1\Delta_g$) generated in the reaction of alkaline H_2O_2 and acetonitrile (a); control without H_2O_2 ; (b) injection of 1 ml of 4 M H_2O_2 after 50 s into 2 ml of 50% acetonitrile in water containing 0.1 ml of 1 M Na_2CO_3 ; (c) injection of sodium azide (to give a 1.7 mM final concentration in the cuvette) 100 s after of the H_2O_2 injection, at the maximum signal as in (b). Injection rate was set to 0.7 ml min^{-1} .

Fig. 3. Monomol light emission spectrum of O_2 ($^1\Delta_g$) generated in the reaction of alkaline H_2O_2 and acetonitrile recorded in the near-infrared region 1200–1350 nm. (A), alkaline H_2O_2 /acetonitrile: 1 ml of 4 M H_2O_2 was injected into 2 ml of 50% acetonitrile in water containing 0.1 ml of 1 M Na_2CO_3 at a flow rate of 0.7 ml min^{-1} ; (B), thermolysis of $DMNO_2$ (15 mM in chloroform) at 40°C ; (C), H_2O_2 /hypochlorite, 2 ml of hypochlorite (0.3 M) was injected into 1 ml of H_2O_2 (3 M) at a flow rate of 1.4 ml min^{-1} .

Fig. 4. Mass spectrum after the reaction of H_2O_2 and acetonitrile in alkaline solution.

To further characterize the generation of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ in this reaction, the effect of sodium azide on CL intensity was examined using both the red PMT detector (Fig. 1, line c compared with line b) and the special monochromator coupled to a highly sensitive PMT (Fig. 2, line c compared with line b). The CL signal intensity was effectively quenched by sodium azide, which is a strong indication that $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ is the emitter. Additionally, neither acetonitrile (Fig. 1a) nor H_2O_2 elicited CL when present alone.

the infrared emission spectrum of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ produced by the reaction of alkaline H_2O_2 with acetonitrile (Fig. 3A). The emission spectra of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ generated in the thermodissociation of DMNO_2 [17] (reaction 3, Fig. 3B) and the H_2O_2 /hypochlorite system [8] (reaction 4, Fig. 3C) were also recorded for comparative purposes. As expected, an emission maximum at 1270 nm, characteristic of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$, was observed in all the systems tested, confirming the generation of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ in the reaction of H_2O_2 and acetonitrile in alkaline solutions.

3.2. Singlet oxygen spectrum

Besides the direct kinetic detection of the monomol emission of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ at 1270 nm, we also recorded

3.3. Detection of the reaction product acetamide by mass spectrometry

The incubation of H_2O_2 and acetonitrile in alkaline media resulted in the formation of acetamide. The

Scheme 1. Reaction of acetonitrile with hydrogen peroxide in alkaline media generating acetamide, water and singlet molecular oxygen.

reaction mixture was analyzed by electrospray ionization MS. The mass spectrum of the product acetamide recorded in the positive mode exhibits a major $[\text{M} + \text{H}]^+$ ion at $m/z = 60$, corresponding to the positively charged molecular ion (Fig. 4). The spectrum also displays an intense $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ion at $m/z = 82$ and $[\text{CH}_3\text{CN} + \text{Na}]^+$ ion at $m/z = 64$ (Fig. 4).

4. Conclusions

Spectroscopic and chemical evidence demonstrate singlet oxygen formation during the reaction of H_2O_2 with acetonitrile in alkaline solution. According to the mechanism proposed by Wiberg in 1953 for oxygen production, we can expect first a nucleophilic attack by the peroxide anion (OOH^-) on the carbon of the nitrile (Scheme 1A), followed by a reaction with a second molecule of H_2O_2 generating acetamide, water and $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (Scheme 1B). Taken together, these novel observations serve as important evidence of $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ production in the reaction of H_2O_2 and acetonitrile in alkaline solution, as initially proposed by McKeown and Waters [1].

Acknowledgements

This work was financially supported by the Brazilian entities FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, CNPq, Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico,

PRONEX/FINEP, Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência, and the Pró-Reitoria de Pesquisa of USP, University of São Paulo. We are deeply indebted to Clécio F. Klitzke for his contribution to the mass spectrometric analyses. E.A.A., S.M. and G.R.M. are recipients of FAPESP fellowships.

References

- [1] E. McKeown, W.A. Waters, *Nature* 4949 (1964) 1063.
- [2] J. Lu, C. Lau, M.K. Lee, M. Kai, *Anal. Chim. Acta* 455 (2002) 193.
- [3] J. Lu, C. Lau, M. Morizono, K. Ohta, M. Kai, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5979.
- [4] A.U. Khan, M. Kasha, *J. Chem. Phys.* 39 (1963) 2105.
- [5] A.U. Khan, M. Kasha, *J. Chem. Phys.* 40 (1964) 605.
- [6] S.J. Arnold, E.A. Ogrysló, H. Witzke, *J. Chem. Phys.* 40 (1964) 1769.
- [7] A.E. Cahill, H. Taube, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 2312.
- [8] A.M. Held, D.J. Halko, J. Hurst, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 5732.
- [9] R.J. Browne, E.A. Ogrysló, *P. Chem. Soc. London, APR* (1964) 117.
- [10] T. Kajiwar, D.R. Kearns, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 5886.
- [11] J.R. Kanofsky, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 5991.
- [12] R.D. Hall, C.F. Chignell, *Photochem. Photobiol.* 45 (1987) 459.
- [13] J.R. Kanofsky, *J. Photochem.* 25 (1985) 105.
- [14] C. Pierlot, J.-M. Aubry, K. Briviba, H. Sies, P. Di Mascio, in: L. Packer, H. Sies (Eds.), *Singlet Oxygen, UV-A & Ozone; Methods Enzymol.* 319 (2000) 3–20.
- [15] E. Cadenas, H. Sies, *Methods Enzymol.* 104 (1984) 221.
- [16] P. Di Mascio, H. Sies, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 2909.
- [17] P. Di Mascio, E.J.H. Bechara, Rubim, J.C. *Appl. Spectrosc.* 46 (1992) 236.

Oxidative and alkylating damage in DNA

Glaucia R. Martinez, Ana Paula M. Loureiro, Sabrina A. Marques,
Sayuri Miyamoto, Lydia F. Yamaguchi, Janice Onuki,
Eduardo A. Almeida, Camila C.M. Garcia, Lívea F. Barbosa,
Marisa H.G. Medeiros, Paolo Di Mascio*

*Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo,
Av. Prof. Lineu Prestes 748, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil*

Received 5 May 2003; received in revised form 15 May 2003; accepted 29 May 2003

Abstract

Modification of cellular DNA upon exposure to reactive oxygen and nitrogen species is the likely initial event involved in the induction of the mutagenic and lethal effects of various oxidative stress agents. Evidence has been accumulated for the significant implication of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), generated as the result of UVA activation of endogenous photosensitizers as porphyrins and flavins. 7,8-Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) has been shown to be the exclusive product of the reaction of $^1\text{O}_2$ with the guanine moiety of cellular DNA, in contrast to the hydroxyl radical, which reacts almost indifferently with all the nucleobases and the sugar moiety of DNA. Furthermore 8-oxodGuo is also produced by other oxidants and can be used as an ubiquitous biomarker of DNA oxidation but can not be a specific marker of any particular species.

The role of DNA etheno adducts in mutagenic and carcinogenic processes triggered by known occupational and environmental carcinogens has also been studied. Much interest in etheno adducts resulted from the detection of increased levels of 1, N^6 -etheno-2'-deoxyadenosine and 3, N^4 -etheno-2'-deoxycytidine in DNA from human, rat and mouse tissues under pathophysiological conditions associated with oxidative stress. A method involving on-line HPLC with electrospray tandem mass spectrometry detection has been developed for the analysis of 1, N^2 -etheno-2'-deoxyguanosine (1, N^2 -edGuo) in DNA. This methodology permits direct quantification of 20 fmol (7.4 adducts/ 10^8 dGuo) of the etheno adduct from approximately 350 μg of crude DNA hydrolysates. This method provides the first evidence of the occurrence of 1, N^2 -edGuo as a basal endogenous lesion and may be utilized to better assess the biological consequences of etheno DNA damage under normal and pathological conditions. This work addresses the importance of isotope labeling associated with mass spectrometry technique for biomolecule damage studies.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Etheno adducts; 2,4-Decadienal; Singlet oxygen; Biomarker; 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine; Naphthalene endoperoxide; HPLC–MS/MS

1. Introduction

Nowadays it is well known that either exogenous or endogenous agents can modify the cellular DNA, along with other cellular components. To ensure

* Corresponding author. Tel.: +55-11-30913815x224;
fax: +55-11-38155579.
E-mail addresses: mhgdmede@iq.usp.br (M.H.G. Medeiros),
pdmascio@iq.usp.br (P. Di Mascio).

normal growth control and accuracy in DNA replication, cells have developed many strategies to manage stress. However, a failure on some of these defense mechanisms may lead to the development of some pathologies such as cancer [1].

Reactive oxygen and nitrogen species might be produced by endogenous sources, as cell aerobic metabolism and inflammation, or by exposure to a variety of chemical and physical agents. The UVA component of solar radiation has been shown to produce deleterious biological effects in which singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$), in its lowest excited state ($^1\Delta_g$), seems to play an important role [2]. We have been studying DNA oxidation by $^1\text{O}_2$ using a ^{18}O -labeled naphthalene endoperoxide as chemical generator of ^{18}O -labeled $^1\text{O}_2$ [3] and detecting the corresponding ^{18}O -labeled products by mass spectrometry [4,5]. It was demonstrated that 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) is the exclusive product in isolated DNA [6] and it is formed directly by the reaction with $^1\text{O}_2$ in cellular media [7].

One of the most important consequences of $^1\text{O}_2$ -induced DNA damage is mutagenesis. The G to T transversions have been related to 8-oxodGuo, which in the *syn* conformation is able to mispair with adenine. Through an in vitro replication assay, several DNA polymerases directly involved in DNA replication, such as pol α , pol δ and pol III, insert preferentially dAMP opposite to 8-oxodGuo [8]. Confirming these assumptions, the replication of modified vectors, containing a single 8-oxodGuo at a specific site, resulted in G to T transversions at the lesion location, in both bacteria [9] and mammalian cells [10].

Exocyclic DNA adducts of endogenous origin are recognized in recent publications as potential biomarkers in the study of oxidative stress and cancer etiology, and also in the assessment of the efficacy of chemopreventive agents against DNA damage and cancer risk [11–15]. With the attempt to clarify some of the mechanisms responsible for the generation of DNA damage, several reactive lipid peroxidation products have long been identified [16–20]. We have shown that the reaction of 2'-deoxyadenosine (dAdo) or 2'-deoxyguanosine (dGuo) with *trans,trans*-2,4-decadienal (DDE) epoxides [21–23] generates two highly mutagenic adducts to mammalian cells [24,25] 1, N^6 -etheno-2'-deoxyadenosine (ϵ dAdo) and 1, N^2 -etheno-2'-deoxyguanosine (1, N^2 - ϵ dGuo), respectively.

2. Implication of singlet oxygen in oxidative DNA damage

Singlet molecular oxygen reacts with electron rich biomolecules such as the guanine moiety of DNA [26]. The mutagenic and genotoxic responses observed when DNA or cells are treated with $^1\text{O}_2$ could be better understood by the identification of the oxidation products generated in this process.

The formation of $^1\text{O}_2$ may involve different physical, chemical and biochemical pathways (Fig. 1). These include, among others, the type II photosensitization mechanism [27], reactions of hydrogen peroxide with either hypochlorite [28] or peroxyxynitrite [29], enzymatic processes of peroxidases and oxidases [30] and decomposition of dioxetanes and endoperoxides [31–33]. Also, the generation of $^1\text{O}_2$ by the Russell mechanism has been pointed out to be a key chemical event responsible for the chemiluminescence arising

(A) Photosensitized generation of $^1\text{O}_2$

(B) Chemical generation of $^1\text{O}_2$

(1) Hydrogen peroxide oxidation

(2)

Fig. 1. Generation of $^1\text{O}_2$ by different sources. (A) Scheme illustrating the photosensitized process, in which the type I mechanism gives rise to radicals intermediates whereas the type II mechanism generates $^1\text{O}_2$ by energy transfer. (B) Chemical sources of $^1\text{O}_2$. (1) Oxidation of hydrogen peroxide by hypochlorite or its disproportionation catalyzed by molybdate ions. (2) Thermolysis of naphthalene endoperoxides with appropriate substituents acting as a pure chemical source of ^{18}O -labeled $^1\text{O}_2$.

Fig. 2. Detection of $^1\text{O}_2$ generated from lipid hydroperoxides by the Russell mechanism. (A) Schematic representation of the Russell mechanism, showing the combination of two peroxy radicals ($\text{LAOO}^\bullet$) through a linear tetraoxide transition state, which decomposes giving: a ketone (LAO), an alcohol (LAOH) and $^1\text{O}_2$ (a) or an excited ketone (LAO^*), an alcohol (LAOH) and oxygen (b). (B) Positive APCI mass spectra of the ^{18}O -labeled DPA endoperoxide ($\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$) detected after incubation of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ (25 mM) and Ce^{4+} (25 mM) in the presence of DPA (60 mM) in chloroform: D_2O (1:1, v/v). (C) Monomol light emission of $^1\text{O}_2$ generated in the reaction of $\text{LAOOH}/\text{Ce}^{4+}$ and from thermolysis of 15 mM 1,4-dimethylnaphthalene endoperoxide (DMNO_2) at 37°C in chloroform.

from lipid peroxidation. Russell proposed that the bimolecular reaction of peroxy radical involves a cyclic mechanism from a linear tetraoxide intermediate, which decomposes to yield an alcohol, ketone and molecular oxygen (Fig. 2A) [34]. It has been postulated that this reaction could either generate oxygen in the singlet excited state [35] (Fig. 2A(a)) at ca. 10% yields or excited triplet ketone (Fig. 2A(b)) at yields

lower than 0.01% [36,37]. The generation of $^1\text{O}_2$ from lipid hydroperoxides has been clearly demonstrated by our group in a recent study using ^{18}O -labeled linoleic acid hydroperoxide ($\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$) [38,39]. The formation of ^{18}O -labeled $^1\text{O}_2$ ($^{18}[^1\text{O}_2]$) in the reaction of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ with metal ions (Ce^{4+} or Fe^{2+}) and peroxyxynitrite was detected by chemical trapping with 9,10-diphenylanthracene (DPA) and HPLC coupled to tandem mass spectrometry (Fig. 2B). The generation of $^1\text{O}_2$ was also unequivocally demonstrated by spectral measurements in the near infrared region showing a characteristic $^1\text{O}_2$ band with emission maximum at 1270 nm (Fig. 2C).

It was shown that $^1\text{O}_2$ is involved in the cell cytotoxicity associated with photodynamic therapy [40] and UVA component of the solar radiation [41]. The involvement of $^1\text{O}_2$ has also been shown in the induction of gene expression and signal transduction [42]. In addition, $^1\text{O}_2$ is generated in phagocytosis [43] where it participates in defense mechanisms against viruses and bacteria. Recently, it has been proposed that $^1\text{O}_2$ could be a substrate for the catalytic function of antibodies generating ozone and hydrogen peroxide in the process [44,45].

In contrast to hydroxyl radical, the reaction of $^1\text{O}_2$ with DNA is highly specific. The reactivity of $^1\text{O}_2$ toward isolated DNA has been studied in detail and the guanine base has been found to be the exclusive target. This reaction generates 8-oxodGuo as a main oxidation product [6]. Using type II photosensitizers, the main products from the reaction of $^1\text{O}_2$ with free dGuo in aqueous solution were identified as the diastereoisomers of spiroiminodihydantoin nucleosides (dSp) [46]. In addition, 8-oxodGuo was also detected [47] but in a relatively lower yield compared to the dSp diastereoisomers. However, under the latter photooxidation conditions, the possibility of concomitant type I photosensitization reactions did not facilitate the investigation. Then, incubation of dGuo with $^1\text{O}_2$ generated in the thermolysis of the hydrophilic endoperoxides of *N,N'*-di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalenedipropylamide (DHPNO₂) or disodium 1,4-naphthalenedipropylanoate (NDPO₂) gave rise mainly to the dSp derivatives and 8-oxodGuo. The formation of both products was proportional to the endoperoxide concentration, confirming the previously reported results [4]. Such a difference observed between free dGuo and isolated DNA may be explained,

Fig. 3. Main oxidation products generated by the reaction of $^1\text{O}_2$ with the guanine moiety. The reaction of $^1\text{O}_2$ with dGuo gives rise to guanine-4,8-endoperoxide, which decomposes to dSp and 8-oxodGuo, the latter is the exclusive product in DNA strands.

at least partly, by the occurrence of reactions within DNA that favor the formation of 8-oxodGuo from the initially produced guanine-4,8-endoperoxide (Fig. 3).

The potential ability for $^1\text{O}_2$ to oxidize cellular DNA was assessed by measuring the level of 8-oxodGuo in DNA of cells incubated with DHPNO₂. The treatment resulted in a three-fold increase on the level of 8-oxodGuo, while the incubation with NDPO₂ did not show any difference related to the control [4]. It may be concluded that the formation of 8-oxodGuo is due almost exclusively to the intracellular generation of $^1\text{O}_2$. This is in agreement with the fact that the endoperoxide used (DHPNO₂) has been shown to have predominantly an intracellular

localization due to its non-ionic chemical character [48]. Furthermore, the ^{18}O -labeled endoperoxide DHPN $^{18}\text{O}_2$ was prepared to assess if the formation of oxidative damage resulted from the direct reaction of $^1\text{O}_2$ with cellular DNA. It has clearly been shown that intracellular formation of ^{18}O -labeled $^1\text{O}_2$ is able to efficiently produce ^{18}O -labeled 8-oxodGuo in the nuclear DNA [7].

In addition, $^1\text{O}_2$ reacts with 8-oxodGuo, and differences in the chemical reaction of $^1\text{O}_2$ with 8-oxodGuo as free nucleoside or when inserted into DNA fragments have been observed. The qualitative identification of the predominant final $^1\text{O}_2$ -oxidation products of 8-oxodGuo was performed using the

accurate HPLC–ESI–MS/MS method and the endoperoxide DHPNO₂ or DHPN¹⁸O₂ acting as a clean chemical source of ¹O₂ [5]. Thus, 2-amino-5-[(2'-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)amino]-4H-imidazol-4-one (dIz), 2,2-diamino-4-[2'-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl] amino]-5-(2H)-oxazolone (dOz) and diastereomeric dSp were found to be the main final stable 8-oxodGuo decomposition products. Mass spectrometry measurements provide evidence for the formation of an oxidized nucleoside that displays the same mass spectrometric characteristics than oxidized guanidinohydantoin 2'-deoxyribonucleoside compound (dGh^{ox}). This product was previously detected as an intermediate in the ¹O₂-mediated oxidation of 8-oxoGua in single stranded DNA, where oxaluric

acid was the predominant final stable decomposition product [49]. Overall, the formation of the currently reported ¹O₂-oxidation products of 8-oxodGuo may be rationalized in term of the transient formation of a 5-hydroperoxide (Fig. 4).

It has been shown that 8-oxodGuo is also a product of DNA oxidation by many other oxidizing processes and reactive species, including one-electron oxidants, hydroxyl radical and peroxyxynitrite [50]. Efforts have been made to develop sensitive techniques to measure this oxidative lesion on DNA as the HPLC separation with electrochemical detection. More recently, the detection by tandem mass spectrometry in the multiple reaction monitoring (MRM) mode appears to be more sensitive and accurate to measure

Fig. 4. Main oxidation products generated by the reaction of ¹O₂ with 8-oxodGuo. The reaction of ¹O₂ with 8-oxodGuo gives rise to 5-hydroperoxide (5-OOH-8-oxodGuo), which decomposes to dSp, dIz, dOz, and dGh^{ox}; however, in DNA strands, it gives rise to dOxa through dGh^{ox} as an intermediate.

oxidative base damage to cellular DNA [51]. Using this technique, it was possible to detect around 0.8 lesions per 10^6 DNA nucleobases of liver young mice [52]. Furthermore, in order to avoid eventual artefactual peaks, it is possible to use immunoaffinity column purification before the HPLC–MS/MS

analysis [53]. The comet assay associated with DNA-specific repair enzymes has been used to monitor oxidized bases in addition to strand breaks. This technique allows an estimation of the purine and pyrimidine base lesions in a limited number of cells [51].

Fig. 5. Structures of some ethano and etheno adducts formed upon reaction of oxidized α,β -unsaturated aldehydes with DNA bases (see references in the text).

3. DNA etheno adducts formation and measurement

Exocyclic DNA adducts of endogenous origin can be generated by several reactive lipid peroxidation products. Among them, 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), malonaldehyde (MDA), acrolein, and crotonaldehyde have been the most widely studied aldehydes with respect to their chemical and biological activities (reviewed in [54]). They have been shown to yield DNA damage either through direct reaction with the DNA bases or through the generation of more reactive electrophilic compounds, such as bifunctional epoxides. In the first case, the products generated are the known cyclic substituted propano adducts, mainly 1,*N*²-propano-2'-deoxyguanosine, for the α,β -unsaturated aldehydes reactions [55,56], and the cyclic pyrimidopurinone (M₁G) and acyclic adducts formed with deoxyadenosine (M₁A) and deoxycytidine (M₁C) for the MDA reactions [57–62]. The epoxy carbonyl compounds resulting from the oxidation of the α,β -unsaturated aldehydes react with the DNA bases giving rise to substituted ethano or etheno adducts and unsubstituted etheno adducts [63–71] (Fig. 5). The ability of these reactive electrophiles to alkylate DNA bases, yielding the aforementioned respective promutagenic lesions, has been considered to contribute to the mutagenic and carcinogenic effects associated with the lipid peroxidation process leading to the oxidative stress (Fig. 6).

DDE has been reported as one of the most toxic lipid hydroperoxide breakdown products to cells [72,73]. Besides ϵ dAdo and 1,*N*²- ϵ dGuo, we have characterized six different etheno derivative adducts generated in the reaction of dAdo or dGuo with DDE epoxides [21–23]. Recently, 4,5-epoxy-2(*E*)-decenal was showed as a precursor of ϵ dAdo and 1,*N*²- ϵ dGuo formation [74], confirming the proposed reaction mechanism [21–23].

The unsubstituted promutagenic etheno adducts, mainly ϵ dAdo and 3,*N*⁴-etheno-2'-deoxycytidine (ϵ dCyd) have been detected as background lesions in rodent and human tissues [13,67,75–82]. However, only a few studies have shown the occurrence of *N*²,3-etheno-2'-deoxyguanosine (*N*²,3- ϵ dGuo) as a DNA background lesion [83–85]. Interestingly, increased levels of ϵ dAdo and ϵ dCyd were observed in clinical situations associated with oxidative stress,

Fig. 6. A possible pathway leading to cancer development as a result of DNA damage.

such as metal storage diseases [86,87] and chronic infections and inflammation [88]. These lesions were also shown to be elevated in colon polyps of patients with familial adenomatous polyposis, who later develop carcinomas in the colon [89], and in white blood cell DNA of women consuming diets rich in polyunsaturated fatty acids [90]. A correlation between the accumulation of arachidonic acid metabolites and the formation of ϵ dAdo and ϵ dCyd was also observed during the tumor promotion phase of the mouse skin two-stage model of carcinogenesis [91].

In vitro studies have shown that the levels of the four unsubstituted etheno adducts (ϵ dAdo, ϵ dCyd, *N*²,3- ϵ dGuo, and 1,*N*²- ϵ dGuo) are increased when nucleosides or DNA are incubated with lipid peroxidation products [21,22,63–65,68,74,92]. Oxidized α,β -unsaturated aldehydes, such as 4-hydroxynonenal, crotonaldehyde, acrolein, and DDE epoxides [21,22,63–66,74,93–95], are possible endogenous adduct sources. Interestingly, 1,*N*⁶-ethenoadenine was also formed from the reaction of DNA with 2-phosphoglycolaldehyde, a model for the 3'-phosphoglycolaldehyde residue generated by oxidation at C3' of 2'-deoxyribose in DNA [96]. Certain carcinogenic exogenous agents, including mucochloric acid, vinyl chloride, and ethyl carbamate (urethane) can also produce etheno adducts [82,97,98].

DNA adducts are excellent biomarkers in determining the extent of genetic damage. These markers are useful in understanding the carcinogenesis mechanism and the assessment of cancer risk imposed by several chemical agents. Considering the importance of detection and quantification of these lesions *in vivo*, the development of sensitive and selective methods is necessary. Several methods, as competitive immunoassay [99], the ultra-sensitive, highly specific gas chromatography/electron capture negative chemi-

cal ionization high-resolution mass spectrometry [69], and liquid chromatography/tandem mass spectrometry (HPLC–ESI–MS/MS) with off-line reversed-phase extraction to purify the adducts from milligram amounts of DNA [21,100] have been employed. On-line immunoaffinity chromatography coupled with HPLC–ESI–MS/MS has recently been applied for the detection and automated quantification of trace levels of ϵ Cyd in crude DNA hydrolysates [81]. The adduct ϵ Ado was detected using a similar method

Fig. 7. HPLC–ESI–MS/MS (MRM mode) detection of 1,N²- ϵ dGuo in DNA extracted from the liver of an untreated eleven-week-old female Wistar rat. (A) 1,N²- ϵ dGuo: m/z 292 → 176; (B) 1 pmol of [¹⁵N₅]-1,N²- ϵ dGuo internal standard: m/z 297 → 181. DNA was isolated by the chaotropic NaI method and hydrolyzed enzymatically. A Shimadzu HPLC system consisting of an autosampler, an automated switching valve, two pumps, and an UV detector was used for sample injection and cleanup of the analytical column (Luna C18(2) 250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μ m, Phenomenex, Torrance, CA) with a gradient of formic acid (0.1% in water) and acetonitrile. A third HPLC pump was used to simultaneously load a second column (C18(2) Phenosphere-Next 150 mm × 2 mm i.d., 3 μ m, Phenomenex) with an isocratic flow of a (50:50) solution of formic acid 0.1% in water:acetonitrile. The position of the switching valve was changed twice: at 24 min, allowing the first column eluent to enter the second column; and at 35 min, permitting the first column to be washed while the adduct was eluted through the second column to the mass spectrometer. The cone voltage was kept at 15 V. The collision energy was set at 10 eV. The pressure of the collision gas (argon) in the gas cell was adjusted to 6.7×10^{-4} mbar. See more details in [70].

[75]. Despite the good sensitivity of the newly developed techniques, the *in vivo* formation of 1,*N*²- ϵ dGuo was just recently demonstrated by our group [70]. We developed a method to quantitatively determine 1,*N*²- ϵ dGuo in DNA samples using on-line HPLC separation with tandem mass spectrometry detection by MRM. This innovative method improved the analytical assay previously reported for 1,*N*²- ϵ dGuo quantification in DNA hydrolysates [21]. The major advantage of the method is the on-line adduct separation from normal nucleosides coupled with the accuracy provided by MS/MS detection. It solves the problems involved in off-line pre-purification steps, allowing for the direct analysis of crude DNA hydrolysates. The addition of an isotopically labeled internal standard (¹⁵N₅-1,*N*²- ϵ dGuo) prior to DNA hydrolysis improves the confidence level of analyses since it allows the correction of any possible loss of analyte during the procedure. This methodology enabled the direct quantification of 20 fmol (7.40 adducts/10⁸ dGuo) of 1,*N*²- ϵ dGuo in 350 μ g of crude DNA hydrolysate and provided the first evidence for the occurrence of 1,*N*²- ϵ dGuo as an endogenous basal lesion (5.22 ± 1.37 adduct/10⁷ dGuo in female rat liver DNA) (Fig. 7). This method can be usefully employed to assess the biological levels of 1,*N*²- ϵ dGuo under normal and pathological conditions.

The biological relevance of the occurrence of 1,*N*²- ϵ dGuo in DNA has been revealed by studies showing the mutagenicity of this adduct. *In vitro* misincorporation studies showed that 1,*N*²- ϵ dGuo tends to strongly block replication at and beyond the site of substitution and to favor the misincorporation of dATP and dGTP across it [101]. Another study, in which miscoding opposite this adduct in an *E. coli*/M13MB19-based system was examined, has shown that it is mutagenic in *E. coli* *uvrA*[−], with more abundant G $\rightarrow$ A mutations, followed by G $\rightarrow$ T mutations [102]. 1,*N*²- ϵ dGuo also generates deletions, rearrangements, double mutants and base pair substitutions at sites near the 1,*N*²- ϵ dGuo site [25]. Recently, Sapparbaev et al. [103] have reported that 1,*N*²-etheno-guanine (1,*N*²- ϵ Gua) is a primary substrate of *E. coli* mismatch-specific uracil–DNA glycosylase and human alkylpurine–DNA–*N*-glycosylase. These data reinforce the potential biological relevance of this adduct.

4. Conclusion

This work addresses the importance of isotope labeling associated with mass spectrometry technique for biomolecule damage studies. Using the chemical source of ¹⁸O-labeled ¹O₂, it was possible to study mechanistic aspects of ¹O₂ induced-DNA oxidation. Furthermore, the use of HPLC–MS/MS with isotopically labeled standard provides a high sensitive and specific method that enables basal levels detection of 1,*N*²- ϵ dGuo in DNA from *in vivo* samples.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Brazilian entities FAPESP—Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, CNPq—Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico, PRONEX/FINEP—Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência, and the Pró-Reitoria de Pesquisa of USP—University of São Paulo. G.R.M., A.P.M.L., S.A.M., S.M., L.F.Y., J.O. and E.A.A. are recipients of FAPESP fellowships. L.F.B. and C.C.M.C. are recipients of CNPq fellowships.

References

- [1] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed., Oxford University Press, New York, 1999.
- [2] R.M. Tyrrell, Role for singlet oxygen in biological effects of ultraviolet A radiation, *Methods Enzymol.* 319 (2000) 290–296.
- [3] G.R. Martinez, J.-L. Ravanat, M.H.G. Medeiros, J. Cadet, P. Di Mascio, Synthesis of a naphthalene endoperoxide as a source of ¹⁸O-labeled singlet oxygen for mechanistic studies, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 10212–10213.
- [4] G.R. Martinez, J.-L. Ravanat, M.H.G. Medeiros, J. Cadet, P. Di Mascio, Naphthalene endoperoxide as a source of [¹⁸O]-labeled singlet oxygen for oxidative DNA damage studies, *Trends Photochem. Photobiol.* 9 (2002) 25–39.
- [5] G.R. Martinez, J.-L. Ravanat, M.H.G. Medeiros, J. Cadet, P. Di Mascio, [¹⁸O]-labeled singlet oxygen as a tool for mechanistic studies of 8-oxo-7,8-dihydroguanine oxidative damage: detection of spiroiminodihydantoin, imidazolone and oxazolone derivatives, *Biol. Chem.* 383 (2002) 607–617.
- [6] J.-L. Ravanat, C. Saint-Pierre, P. Di Mascio, G.R. Martinez, M.H.G. Medeiros, J. Cadet, Damage to isolated DNA mediated by singlet oxygen, *Helv. Chim. Acta* 84 (2001) 3702–3709.

- [7] J.-L. Ravanat, P. Di Mascio, G.R. Martinez, M.H.G. Medeiros, J. Cadet, Singlet Oxygen induces oxidation of cellular DNA, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 40601–40604.
- [8] S. Shibutani, M. Takeshita, A.P. Grollman, Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG, *Nature* 349 (1991) 431–434.
- [9] K.C. Cheng, D.S. Cahill, H. Kasai, S. Nishimura, L.A. Loeb, 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage causes G–T and A–C substitutions, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 166–172.
- [10] M. Moriya, Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammals—cells—8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C–T.A transversions in simian kidney-cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (2003) 1122–1126.
- [11] L.J. Marnett, Oxyradicals and DNA damage, *Carcinogenesis* 21 (2000) 361–370.
- [12] L.J. Marnett, J.P. Plataras, Endogenous DNA damage and mutation, *Trends Genet.* 17 (2001) 214–221.
- [13] H. Bartsch, J. Nair, New DNA-based biomarkers for oxidative stress and cancer chemoprevention studies, *Eur. J. Cancer* 36 (2000) 1229–1234.
- [14] H. Bartsch, J. Nair, Ultrasensitive and specific detection methods for exocyclic DNA adducts: markers for lipid peroxidation and oxidative stress, *Toxicology* 153 (2000) 105–114.
- [15] F.P. Guengerich, Forging the links between metabolism and Carcinogenesis, *Mutat. Res.* 488 (2001) 195–209.
- [16] A. Benedetti, M. Comporti, H. Esterbauer, Identification of 4-hydroxynonenal as a cyto-toxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids, *Biochim. Biophys. Acta* 620 (1980) 281–296.
- [17] A. Benedetti, R. Fulceri, M. Comporti, Inhibition of calcium sequestration activity of liver microsomes by 4-hydroxyalkenals originating from the peroxidation of liver microsomal lipids, *Biochim. Biophys. Acta* 793 (1984) 489–493.
- [18] A. Benedetti, M. Comporti, R. Fulceri, H. Esterbauer, Cytotoxic aldehydes originating from the peroxidation of liver microsomal lipids, *Biochim. Biophys. Acta* 792 (1984) 172–181.
- [19] H. Esterbauer, K.H. Cheeseman, M.U. Dianzani, G. Poli, T.F. Slater, Separation and characterization of the aldehydic products of lipid-peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes, *J. Biochem.* 208 (1982) 129–140.
- [20] G. Poli, M.U. Dianzani, K. Cheeseman, T.F. Slater, J. Lang, H. Esterbauer, Separation and characterization of the aldehydic products of lipid-peroxidation stimulated by carbon-tetrachloride or ADP iron in isolated rat hepatocytes and rat-liver microsomal suspensions, *J. Biochem.* 227 (1985) 629–638.
- [21] A.P.M. Loureiro, P. Di Mascio, O.F. Gomes, M.H.G. Medeiros, *Trans,trans*-2,4-decadienal-induced 1,N⁶-etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation, *Chem. Res. Toxicol.* 13 (2000) 601–609.
- [22] V.M. Carvalho, P. Di Mascio, I.P. Arruda-Campos, T. Douki, J. Cadet, M.H.G. Medeiros, Formation of 1,N⁶-etheno-2'-deoxyadenosine adducts by *trans,trans*-2,4-decadienal, *Chem. Res. Toxicol.* 11 (1998) 1042–1047.
- [23] V.M. Carvalho, F. Asahara, P. Di Mascio, I.P. Arruda-Campos, J. Cadet, M.H.G. Medeiros, Novel 1,N⁶-etheno-2'-deoxyadenosine adducts from lipid peroxidation products, *Chem. Res. Toxicol.* 13 (2000) 397–405.
- [24] G.A. Pandya, M. Moriya, 1,N⁶-Ethenodeoxyadenosine, a DNA adduct highly mutagenic in mammalian cells, *Biochemistry* 35 (1996) 11487–11492.
- [25] S. Akasaka, F.P. Guengerich, Mutagenicity of site-specifically located 1,N²-ethenoguanine in Chinese hamster ovary cell chromosomal DNA, *Chem. Res. Toxicol.* 12 (1999) 501–507.
- [26] J. Cadet, T. Douki, J.-P. Pouget, J.-L. Ravanat, Singlet oxygen DNA damage products: formation and measurement, *Methods Enzymol.* 319 (2000) 143–153.
- [27] C.S. Foote, Definition of type I and type II photosensitized oxidation, *Photochem. Photobiol.* 54 (1991) 659.
- [28] A.M. Held, D.J. Halko, J.K. Hurst, Mechanisms of chlorine oxidation of hydrogen peroxide, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 5732–5740.
- [29] P. Di Mascio, E.J.H. Bechara, M.H.G. Medeiros, K. Briviba, H. Sies, Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxynitrite with hydrogen peroxide, *FEBS Lett.* 355 (1994) 287–289.
- [30] J.R. Kanofsky, Singlet oxygen production by biological systems, *Chem. Biol. Interact.* 70 (1989) 1–28.
- [31] G. Cilento, in: W. Adam, G. Cilento (Eds.), *Chemical and Biological Generation of Excited States*, Academic Press, New York, 1982.
- [32] W. Adam, C.R. Saha-Möller, A. Schönberger, Photo-oxidation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by thermally generated triplet-excited ketones from 3-(hydroxymethyl)-3,4,4-trimethyl-1,2-dioxetane and comparison with type I and type II photosensitizers, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 9233–9238.
- [33] C. Pierlot, J.M. Aubry, K. Briviba, H. Sies, P. Di Mascio, Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media, *Methods Enzymol.* 319 (2000) 3–20.
- [34] G.A. Russell, Deuterium-isotope effects in the autoxidation of alkyl hydrocarbons. Mechanism of the interaction of peroxy radicals, *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 3871–3877.
- [35] J.A. Howard, K.U. Ingold, The self-reaction of *sec*-butyl-peroxy radicals. Confirmation of the Russell mechanism, *J. Am. Chem. Soc.* 90 (1968) 1057–1058.
- [36] Q. Niu, G.D. Mendenhall, Structural effects on the yields of singlet molecular oxygen (¹Δ_gO₂) from alkylperoxy radical recombination, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 1656–1657.
- [37] G.D. Mendenhall, X.C. Sheng, Yields of excited carbonyl species from alkoxyl and from alkylperoxy radical dismutation, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 8976–8977.
- [38] S. Miyamoto, G.R. Martinez, M.H.G. Medeiros, P. Di Mascio, Singlet molecular oxygen generated from lipid hydroperoxides by the Russell mechanism: studies using ¹⁸O-labeled linoleic acid hydroperoxide and monomol light emission measurements, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 6172–6179.
- [39] S. Miyamoto, G.R. Martinez, A.P.B. Martins, M.H.G. Medeiros, P. Di Mascio, Direct evidence of singlet molecular

- oxygen [$O_2(^1\Delta_g)$] production in the reaction of linoleic acid hydroperoxide with peroxynitrite, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 4510–4517.
- [40] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbek, J. Moan, Q. Peng, Photodynamic therapy, *J. Natl. Cancer Inst.* 90 (1998) 889–905.
- [41] J. Krutmann, Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatitis, *J. Dermatol. Sci.* 23 (2000) S22–S26.
- [42] L.O. Klotz, K.D. Kroncke, H. Sies, Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2 (2003) 88–94.
- [43] M.J. Steinbeck, A.U. Khan, M.J. Karnovsky, Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 13425–13433.
- [44] P. Wentworth Jr., J.E. McDunn, A.D. Wentworth, C. Takeuchi, J. Nieva, T. Jones, C. Bautista, J.M. Ruedi, A. Gutierrez, K.D. Janda, B.M. Babior, A. Eschenmoser, R.A. Lerner, Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation, *Science* 298 (2002) 2195–2199.
- [45] B.M. Babior, C. Takeuchi, J. Ruedi, A. Gutierrez, P. Wentworth Jr., Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 3031–3034.
- [46] J.C. Niles, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, Spiroimino-dihydantoin is the major product of 8-oxo-7,8-dihydro-guanosine reaction with peroxynitrite in the presence of thiols and guanosine photooxidation by methylene blue, *Org. Lett.* 3 (2001) 963–966.
- [47] J. Cadet, M. Berger, T. Douki, B. Morin, S. Raoul, J.-L. Ravanat, S. Spinelli, Effects of UV and visible radiation on DNA-final base damage, *Biol. Chem.* 378 (1997) 1275–1286.
- [48] L.O. Klotz, C. Pellieux, K. Briviba, C. Pierlot, J.M. Aubry, H. Sies, Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA, *Eur. J. Biochem.* 260 (1999) 917–922.
- [49] V. Duarte, D. Gasparutto, L.F. Yamaguchi, J.-L. Ravanat, G.R. Martinez, M.H.G. Medeiros, P. Di Mascio, J. Cadet, Oxaluric acid as the major product of singlet oxygen-mediate oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 12622–12628.
- [50] C.J. Burrows, J.G. Muller, Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1109–1151.
- [51] J. Cadet, T. Douki, S. Frelon, S. Sauvaigo, J.-P. Pouget, J.-L. Ravanat, Assessment of oxidative base damage to isolated and cellular DNA by HPLC–MS/MS measurement, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (2002) 441–449.
- [52] J. Cadet, T. Douki, S. Frelon, D. Gasparutto, J.-L. Ravanat, S. Sauvaigo, G.R. Martinez, M.H.G. Medeiros, P. Di Mascio, Oxidative damage to DNA: formation and measurement, in: C. Pasquier (Ed.), *Proceedings of the 11th Conference of SFRRI*, Paris 2002, Monduzzi Editore, S.P.A. Bologna, Italy, 2002, pp. 129–135.
- [53] R. Singh, M. McEwan, J.H. Lamb, R.M. Santella, P.B. Farmer, An improved liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in DNA samples using immunoaffinity column purification, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 126–134.
- [54] H. Esterbauer, R.J. Schaur, H. Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free Radic. Biol. Med.* 11 (1991) 81–128.
- [55] C.K. Winter, H.J. Segall, W.F. Haddon, Formation of cyclic adducts of deoxyguanosine with the aldehydes *trans*-4-hydroxy-2-hexenal and *trans*-4-hydroxy-2-nonenal in vitro, *Cancer Res.* 46 (1986) 5682–5686.
- [56] P. Yi, D. Zhan, V.M. Samokyszyn, D.R. Doerge, P.P. Fu, Synthesis and ^{32}P -postlabeling/high-performance liquid chromatography separation of diastereomeric 1, N^2 -(1,3-propano)-2'-deoxyguanosine 3'-phosphate adducts formed from 4-hydroxy-2-nonenal, *Chem. Res. Toxicol.* 10 (1997) 1259–1265.
- [57] H. Seto, T. Okuda, T. Takesue, T. Ikemura, Reaction of malondialdehyde with nucleic acid. I. Formation of fluorescent pyrimido[1,2- α]purin-10(3H)-one nucleosides, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 56 (1983) 1799–1802.
- [58] V. Nair, G.A. Turner, R.J. Offerman, Novel adducts from the modification of nucleic acid bases by malondialdehyde, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 3370–3371.
- [59] L.J. Marnett, A.K. Basu, S.M. O'Hara, P.E. Weller, A.F.M.M. Rahman, J.P. Oliver, Reaction of malondialdehyde with guanine nucleosides: formation of adducts containing oxadiazabicyclononene residues in the base-pairing region, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 1348–1350.
- [60] K. Stone, M. Ksebati, L.J. Marnett, Investigation of the adducts formed by reaction of malondialdehyde with adenosine, *Chem. Res. Toxicol.* 3 (1990) 33–38.
- [61] K. Stone, A. Uzieblo, L.J. Marnett, Studies of the reaction of malondialdehyde with cytosine nucleosides, *Chem. Res. Toxicol.* 3 (1990) 467–472.
- [62] L.J. Marnett, Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde, in: B. Singer, H. Bartsch (Eds.), *Exocyclic DNA Adducts in Mutagenesis and Carcinogenesis*, IARC Scientific Publication 150, Lyon, IARC, 1999, pp. 17–27.
- [63] B.M. Goldschmidt, T.P. Blazej, B.L. Van Duuren, The reaction of guanosine and deoxyguanosine with glycidaldehyde, *Tetrahedron Lett.* 13 (1968) 1583–1586.
- [64] V. Nair, R.J. Offerman, Ring-extended products from the reaction of epoxy carbonyl-compounds and nucleic-acid bases, *J. Org. Chem.* 50 (1985) 5627–5631.
- [65] R.S. Sodem, F.L. Chung, 1, N^2 -ethenodeoxyguanosine as a potential marker for DNA adduct formation by *trans*-4-hydroxy-2-nonenal, *Cancer Res.* 48 (1988) 320–323.
- [66] B.T. Golding, P.K. Slaich, G. Kennedy, C. Bleasdale, W.P. Watson, Mechanisms of formation of adducts from reactions of glycidaldehyde with 2'-deoxyguanosine and/or guanosine, *Chem. Res. Toxicol.* 9 (1996) 147–157.
- [67] F.L. Chung, H.J. Chen, R.G. Nath, Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts, *Carcinogenesis* 17 (1996) 2105–2111.

- [68] A.J. Ham, A. Ranasinghe, H. Koc, J.A. Swenberg, 4-Hydroxy-2-nonenal and ethyl linoleate form $N^2,3$ -ethenoguanine under peroxidizing conditions, *Chem. Res. Toxicol.* 13 (2000) 1243–1250.
- [69] E.J. Morinello, A.J. Ham, A. Ranasinghe, R. Sangaiah, J.A. Swenberg, Simultaneous quantitation of $N^2,3$ -ethenoguanine and $1,N^2$ -ethenoguanine with an immunoaffinity/gas chromatography/high-resolution mass spectrometry assay, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 327–334.
- [70] A.P.M. Loureiro, S.A. Marques, C.C.M. Garcia, P. Di Mascio, M.H.G. Medeiros, Development of an on-line liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry assay to quantitatively determine $1,N^2$ -etheno-2'-deoxyguanosine in DNA, *Chem. Res. Toxicol.* 15 (2002) 1302–1308.
- [71] A.P.M. Loureiro, P. Di Mascio, M.H.G. Medeiros, Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese, *Quim. Nova* 25 (2002) 777–793.
- [72] T. Kaneko, S. Honda, S. Nakano, M. Matsuo, Lethal effects of a linoleic acid hydroperoxide and its autooxidation products, unsaturated aliphatic aldehydes, on human diploid fibroblasts, *Chem. Biol. Interact.* 63 (1987) 127–137.
- [73] T. Kaneko, K. Kaji, M. Matsuo, Cytotoxicities of a linoleic acid hydroperoxide and its related aliphatic aldehydes toward cultured human umbilical vein endothelial cells, *Chem. Biol. Interact.* 67 (1988) 295–304.
- [74] S.H. Lee, T. Oe, I.A. Blair, 4,5-Epoxy-2(E)-decenal-induced formation of $1,N^6$ -etheno-2'-deoxyadenosine and $1,N^2$ -etheno-2'-deoxyguanosine adduct, *Chem. Res. Toxicol.* 15 (2002) 300–304.
- [75] D.R. Doerge, M.I. Churchwell, J.L. Fang, F.A. Beland, Quantification of etheno DNA adducts using liquid chromatography, on-line sample processing, and electrospray tandem mass spectrometry, *Chem. Res. Toxicol.* 13 (2000) 1259–1264.
- [76] H.J.C. Chen, L.C. Chiang, M.C. Tseng, L.L. Zhang, J. Ni, F.L. Chung, Detection and quantification of $1,N^6$ -ethenoadenine in human placental DNA by mass spectrometry, *Chem. Res. Toxicol.* 12 (1999) 1119–1126.
- [77] J. Nair, A. Barbin, Y. Guichard, H. Bartsch, $1,N^6$ -Etheno-deoxyadenosine and $3,N^4$ -ethenodeoxycytidine in liver DNA from humans and untreated rodents detected by immunoaffinity/ ^{32}P -postlabeling, *Carcinogenesis* 16 (1995) 613–617.
- [78] R.R. Misra, S.Y. Chiang, J.A. Swenberg, A comparison of two ultrasensitive methods for measuring $1,N^6$ -etheno-2'-deoxyadenosine and $3,N^4$ -etheno-2'-deoxycytidine in cellular DNA, *Carcinogenesis* 15 (1994) 1647–1652.
- [79] J. Nair, A. Barbin, I. Velic, H. Bartsch, Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species, *Mutat. Res.* 424 (1999) 59–70.
- [80] W.P. Watson, J.P. Aston, T. Barlow, A.E. Crane, D. Potter, T. Brown, Detection of $1,N^6$ -etheno-2'-deoxyadenosine and $3,N^4$ -etheno-2'-deoxycytidine occurring endogenously in DNA, in: IARC Scientific Publication 150, Lyon, France, 2000, pp. 63–73.
- [81] D.W. Roberts, M.I. Churchwell, F.A. Beland, J.L. Fang, D.R. Doerge, Quantitative analysis of etheno-2'-deoxycytidine DNA adducts using on-line immunoaffinity chromatography coupled with LC/ES–MS/MS detection, *Anal. Chem.* 73 (2001) 303–309.
- [82] H. Bartsch, A. Barbin, M.J. Marion, J. Nair, Y. Guichard, Formation, detection, and role in carcinogenesis of ethenobases in DNA, *Drug Metab. Rev.* 26 (1994) 349–371.
- [83] N. Fedtke, J. A. Boucheron, V.E. Walker, J. A. Swenberg, Vinyl chloride-induced DNA adducts. II. Formation and persistence of 7-(2'-oxoethyl)guanine and $N^2,3$ -ethenoguanine in rat tissue DNA, *Carcinogenesis* 11 (1990) 1287–1292.
- [84] T.Y. Yen, N.I. Christova-Gueogueieva, N. Scheller, S. Holt, J.A. Swenberg, M.J. Charles, Quantitative analysis of the DNA adduct $N^2,3$ -ethenoguanine using liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 31 (1996) 1271–1276.
- [85] A.J.L. Ham, A. Ranasinghe, E.J. Morinello, J. Nakamura, P.B. Upton, F. Johnson, J.A. Swenberg, Immunoaffinity/gas chromatography/high-resolution mass spectrometry method for the detection of $N^2,3$ -ethenoguanine, *Chem. Res. Toxicol.* 12 (1999) 1240–1246.
- [86] J. Nair, P.L. Carmichael, R.C. Fernando, D.H. Phillips, A.J. Strain, H. Bartsch, Lipid peroxidation-induced etheno-DNA adducts in the liver of patients with the genetic metal storage disorders Wilson's disease and primary hemochromatosis, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7 (1998) 435–440.
- [87] J. Nair, H. Sone, M. Nagao, A. Barbin, H. Bartsch, Copper-dependent formation of miscoding etheno-DNA adducts in the liver of Long–Evans–Cinnamon (LEC) rats developing hereditary hepatitis and hepatocellular carcinoma, *Cancer Res.* 56 (1996) 1267–1271.
- [88] J. Nair, A. Gal, S. Tamir, S.R. Tannenbaum, G.N. Wogan, H. Bartsch, Etheno adducts in spleen DNA of SJL mice stimulated to overproduce nitric oxide, *Carcinogenesis* 19 (1998) 2081–2084.
- [89] K. Schmid, J. Nair, G. Winde, I. Velic, H. Bartsch, Increased levels of promutagenic etheno-DNA adducts in colonic polyps of FAP patients, *Int. J. Cancer* 87 (2000) 1–4.
- [90] J. Nair, C.E. Vaca, I. Velic, M. Mutanen, L.M. Valsta, H. Bartsch, High dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids drastically increase the formation of etheno-DNA base adducts in white blood cells of female subjects, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6 (1997) 597–601.
- [91] J. Nair, G. Furstenberger, F. Burger, F. Marks, H. Bartsch, Promutagenic etheno-DNA adducts in multistage mouse skin carcinogenesis: correlation with lipoxygenase-catalyzed arachidonic acid metabolism, *Chem. Res. Toxicol.* 13 (2000) 703–709.
- [92] F. El Ghissassi, A. Barbin, J. Nair, H. Bartsch, Formation of $1,N^6$ -ethenoadenine and $3,N^4$ -ethenocytosine by lipid peroxidation products and nucleic acid bases, *Chem. Res. Toxicol.* 8 (1995) 278–283.
- [93] H.J. Chen, L. Zhang, J. Cox, J.A. Cunningham, F.L. Chung, DNA adducts of 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal: detection of 7-(1',2'-dihydroxyheptyl)-3H-imidazo[2,1-i] purine and $1,N^6$ -ethenoadenine by gas chromatography/negative ion chemical ionization/mass spectrometry, *Chem. Res. Toxicol.* 11 (1998) 1474–1480.

- [94] R.S. Sodom, F.-L. Chung, Stereoselective formation of in vitro nucleic acid adducts by 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal, *Cancer Res.* 51 (1991) 137–143.
- [95] H.-J.C. Chen, F.-Y. Chung, Epoxidation of *trans*-4-hydroxy-2-nonenal by fatty acid hydroperoxides and hydrogen peroxide, *Chem. Res. Toxicol.* 9 (1996) 306–312.
- [96] M. Awada, P.C. Dedon, Formation of the 1,*N*²-glyoxal adduct of deoxyguanosine by phosphoglycolaldehyde, a product of 3'-deoxyribose oxidation in DNA, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 1247–1253.
- [97] J.A. Swenberg, N. Fedtke, F. Ciroussel, A. Barbin, H. Bartsch, Etheno adducts formed in DNA of vinyl chloride-exposed rats are highly persistent in liver, *Carcinogenesis* 13 (1992) 727–729.
- [98] G. Eberle, A. Barbin, R.J. Laib, F. Ciroussel, J. Thomale, H. Bartsch, M.F. Rajewsky, 1,*N*⁶-Etheno-2'-deoxyadenosine and 3,*N*⁴-etheno-2'-deoxycytidine detected by monoclonal antibodies in lung and liver DNA of rats exposed to vinyl chloride, *Carcinogenesis* 10 (1989) 209–212.
- [99] P.G. Foiles, L.M. Miglietta, A. Nishikawa, J.T. Kusmirek, B. Singer, F.L. Chung, Development of monoclonal antibodies specific for 1,*N*²-ethenodeoxyguanosine and *N*²,3-ethenodeoxyguanosine and their use for quantitation of adducts in G12 cells exposed to chloroacetaldehyde, *Carcinogenesis* 14 (1993) 113–116.
- [100] M. Müller, F.J. Belas, I.A. Blair, F.P. Guengerich, Analysis of 1,*N*²-ethenoguanine and 5,6,7,9-tetrahydro-7-hydroxy-9-oxoimidazo[1,2-*a*] purine in DNA treated with 2-chlorooxirane by high performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and comparison of amounts to other DNA adducts, *Chem. Res. Toxicol.* 10 (1997) 242–247.
- [101] S. Langouët, M. Müller, F.P. Guengerich, Misincorporation of dNTPs opposite 1,*N*²-ethenoguanine and 5,6,7,9-tetrahydro-7-hydroxy-9-oxoimidazo[1,2-*a*]purine in oligonucleotides by *Escherichia coli* polymerases I *exo*[−] and II *exo*[−], T7 polymerase *exo*[−] human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase, and rat polymerase β, *Biochemistry* 36 (1997) 6069–6079.
- [102] S. Langouët, A.N. Mican, M. Müller, S.P. Fink, L.J. Marnett, S.A. Muhle, F.P. Guengerich, Misincorporation of nucleotides opposite five-membered exocyclic ring guanine derivatives by *Escherichia coli* polymerases in vitro and in vivo: 1,*N*²-ethenoguanine, 5,6,7,9-tetrahydro-9-oxoimidazo[1,2-*a*]purine, and 5,6,7,9-tetrahydro-7-hydroxy-9-oxoimidazo[1,2-*a*]purine, *Biochemistry* 37 (1998) 5184–5193.
- [103] M. Saparbaev, S. Langouët, C.V. Privezentzev, F.P. Guengerich, H. Cai, R.H. Elder, J. Laval, 1,*N*²-Ethenoguanine, a mutagenic DNA adduct, is a primary substrate of *Escherichia coli* mismatch-specific uracil-DNA glycosylase and human alkylpurine-DNA-*N*-glycosylase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 26987–26993.

DNA and Lipid Damage in the Brown Mussel *Perna perna* from a Contaminated Site

E. A. Almeida,¹ A. C. D. Bainy,² A. P. M. Loureiro,¹ M. H. G. Medeiros,¹
P. Di Mascio¹

¹ Department of Biochemistry, Chemistry Institute, São Paulo University, CP 26.077, 05513-970, São Paulo, SP, Brazil

² Department of Biochemistry, Biologic Science Center, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

Received: 6 September 2002/Accepted: 17 April 2003

Much work has focused on DNA and lipid damage resulting from interactions among reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) and associated oxidants produced during biotransformation of certain xenobiotics (Livingstone 2001). The presence of DNA strand breaks is generally determined by gel separation after denaturation or unwinding under alkaline conditions, or by the Comet assay, which measures the electrophoretic migration of relaxed or fragmented DNA away from the nuclei of cells immobilized in agarose (Steinert 1999). More recently, the evaluation of modified DNA bases such as 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) has proved to be a good indicator of oxidative stress caused by xenobiotic exposure in marine organisms (Mallins and Haimanot 1990; Canova et al. 1998; Rodríguez-Ariza et al. 1999; Livingstone 2001). Moreover, membrane lipid oxidation induced by ROS and RNS, leads to the formation of fatty acid hydroperoxides and other reactive products, including a wide range of aldehydic compounds, which can be measured in invertebrates as indicators of pollutant injury (Pellerin-Massicote 1994). In this work, we compared the levels of 8-oxodGuo and lipid peroxidation product levels in mussels *Perna perna* transplanted from a reference to a contaminated site on the Santa Catarina Island.

The reference site, located at the mussel farming area of the Federal University of Santa Catarina, on Sambaqui beach, was selected based on a previous report about the quality of seawater for mollusk farming in this region (Cerutti 1996). Mussels from this site were placed on nylon nets and transferred to the contaminated site (at North Bay, Figure 1). Some studies have indicated that North Bay is critically affected by pollution since this area is the main target for the urban wastewater discharges of Florianópolis city (Cerutti 1996, Benato 1999). Higher levels of nickel, copper, cadmium, and manganese were observed in the seawater collected at this site when compared to the reference site, respectively at 3, 6.53, 2.5 and 0.33-fold (Pozebon 1998). In addition, a previous study suggested that the urban wastewater discharges associated with the elevated rainfall index in this area caused changes in biochemical defense systems in transplanted mussels (Bainy et al. 2000).

MATERIALS AND METHODS

Mussels *Perna perna* of similar length (3 to 4 cm) were collected and transplanted from a clean (reference) to a contaminated site at Santa Catarina Island (Florianópolis, SC, Brazil, figure 1). After 12 months of exposure, mussels were collected in both reference

Figure 1. Map of the Santa Catarina State and the Florianópolis city (Santa Catarina Island), indicating the reference site (1, Sambaqui beach) and the contaminated site (2, North Bay).

and contaminated sites and their digestive glands, gills and mantle tissues were dissected and immediately immersed in liquid nitrogen (-196°C). Mussels from both sites were collected on the same day, respectively at 9:00 and 10:30 A.M. The water temperature was 18 and 19.5°C and the pH was 8.0 and 7.8 in the contaminated and reference sites, respectively. According to data provided by the *Fundação do Meio Ambiente* (FATMA), at the day of collection, the levels of faecal coliforms were 11000 and 230 coliforms/100mL of water (median of 5 different collected aliquots) in contaminated and reference sites, respectively. Levels higher than 1000 coliforms/100mL of seawater indicate that the area is unsuitable for bathing.

DNA was isolated using the chaotropic NaI method (Wang et al. 1994; Helbock et al. 1998) with some modifications. Briefly, 500 mg of tissues were homogenized in 10 mL of buffer A (320 mM sucrose, 5 mM MgCl_2 , 10 mM Tris HCl, 0.1 mM desferoxamine and 1% Triton X 100, pH 7.5). After centrifugation at 1500 g for 10 min, the pellets were suspended in 5 mL of 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 5 mM EDTA, 0.15 mM desferoxamine and 10% SDS. The RNase A (150 μL , 1mg/mL) and RNase T1 (40 μL , 1000 U/mL) in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 1 mM EDTA and 2.5 mM desferoxamine were added and the reaction mixture was incubated at 37°C . After 1 hour, 150 μL proteinase K (20 mg/mL) was added followed by additional incubation at 37°C for 1 h. After centrifugation at 5000 g for 15 min, the liquid phase was collected and 3 mL of 7.6 M NaI was added, followed by the addition of 3 mL of isopropanol. The content in the tube was well mixed by inversion until a whitish precipitate appeared. The precipitate was collected by centrifugation at 5000 g for 15 min and washed with 3 mL of isopropanol 40% (w/v), followed by 3mL of ethanol 70% (w/v). After additional centrifugation at 5000 g for 15 min, the DNA pellet was

solubilized in 300 μL of desferoxamine (0.1 mM). The DNA concentration was measured spectrophotometrically at 260 nm and its purity was assessed by ensuring that $A_{260}/A_{280} > 1.75$. DNA (100 μg) was diluted in 200 μL of deionized water, followed by the addition of 4 μL of 1 M sodium acetate buffer (pH 5.5) plus 5 units of nuclease P_1 and incubated at 37°C for 30 min. A total of 20 μL of 1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) and 2 units of calf intestinal alkaline phosphatase were then added, followed by 1 h incubation at 37°C according to Fiala et al. (1999). Chloroform was then added (1:1 vol), the samples were centrifuged and the aqueous layer collected for the analysis.

The level of 8-oxodGuo was measured by High Performance Liquid Chromatography coupled to electrochemical detection (HPLC/ECD) using a Shimadzu model LC-10AD/VP pump with a Phenomenex Spherex 5 C18 column (250 X 4.6 mm i.d., 5 μm particle size), a Shimadzu SPD-10AV/VP UV detector at 254 nm and an electrochemical coulometric detector (ESA *coulchem II 5021* Massachusetts, USA) with potentials set at 120 and 280 mV in electrodes 1 and 2, respectively (Laws and Adams 1996; Rodriguez-Ariza et al. 1999; Beckman et al. 2000). Shimadzu Class-LC10 1.6 software was used to calculate the peak areas. The mobile phase consisted of potassium phosphate buffer (0.05 M, pH 5.5) containing 10% methanol pumped at a flow rate of 1 mL/min. The level of dGuo in the hydrolysate was simultaneously quantified using an UV detector set at 254 nm.

Lipid peroxidation products were evaluated by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method, as described by Ghatak and Ho (1996). Tissues were homogenized in 0.25M sucrose solution (tissue to sucrose solution ratio = 1:50). 500 μL of whole tissue homogenate were mixed with 100 μL of 10% SDS, 1.5 mL of 200 mM sodium acetate (pH 3.75), and 1.5 mL of 1% aqueous solution of thiobarbituric acid. The reaction mixture was brought up to 4 mL with MilliQ water, and heated in a boiling water bath for 60 min at 100°C. The colored derivative was extracted with 1 mL *n*-butanol and quantified at 532 nm, in terms of a malonaldehyde standard.

Statistical analyses were performed with the aid of the Micrococcal Origin 6.0 software (Northampton, MA, USA). Results are presented as mean $\pm$ standard deviation. Significant differences between different groups were studied using *t*-test and one-way analysis of variance, and only $p < 0.05$ was accepted as significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the level of 8-oxodGuo in digestive gland, gill and mantle of mussels from contaminated and reference sites. With regard to basal levels, 8-oxodGuo was higher in mantle tissue and digestive gland than in gills, probably due to composition and functional differences between the three tissues (i.e., antioxidant and lipid content, metabolic rate and DNA repair activity). Moreover, it has been shown that the digestive gland is the main target tissue for biotransformation in mussels (Livingstone and Pipe 1992), evidenced by higher activities of Phase I enzymes than other tissues. Interestingly, the mussel *P. perna* has about 10-fold lower levels of 8-oxodGuo than *Mytilus galloprovincialis*, as reported by Canova et al. (1998) and Akcha et al. (2000). On the other hand, mussel *P. perna* showed similar levels of 8-oxodGuo than levels observed in the digestive gland of the mangrove mussel *Mytella guyanensis* (Torres et al. 2002).

Table 1. Levels of 8-oxodGuo in digestive glands, gills and mantle tissues of mussels collected in the reference and polluted sites. Data are expressed as residues of 8-oxodGuo/10⁶ dGuo.

Tissue	Reference	Contaminated
Digestive glands	12.8 ± 5.4 (8)	* 24.2 ± 4.8 (10)
Gills	5.8 ± 2.2 (10)	* 9.4 ± 3.0 (9)
Mantle tissue	13.6 ± 3.9 (8)	18.1 ± 6.6 (8)

* Statistical differences (p<0.05). Numbers in parenthesis indicates the number of samples analyzed.

After 12 months of exposure, mussels from the reference site showed 12.8 ± 5.4 residues of 8-oxodGuo/10⁶ dGuo in digestive gland and 5.8 ± 2.2 residues of 8-oxodGuo/10⁶ dGuo in gills. In contrast, mussels from the contaminated site showed 24.2 ± 4.8 residues of 8-oxodGuo/10⁶ dGuo in digestive glands and 9.4 ± 3.0 residues of 8-oxodGuo/10⁶ dGuo in gills, representing levels of 8-oxodGuo 1.9-fold and 1.6-fold higher than control site, respectively. No differences were observed in the levels of 8-oxodGuo of mantle tissue between the groups. Based on these results we suggest that there is an association between contaminant exposure and increased oxidative DNA damage. Accordingly, Canova *et al.* (1998) observed higher levels of 8-oxodGuo in gills and digestive glands of mussels exposed to benzo[*a*]pyrene. Torres *et al.* (2002) observed higher levels of 8-oxodGuo in digestive glands of mussels *M. guyanensis* collected at a polluted mangrove. Mallins and Haimanot (1990) detected a significant increase in the levels of 8-oxodGuo in fishes collected at a contaminated area. In addition, Rodríguez-Ariza *et al.* (1999) observed elevated levels of 8-oxodGuo in the fish *Sparus aurata* exposed to dieldrin, paraquat and copper or when sampled at contaminated areas. Contrariwise, Akcha *et al.* (2000) observed no differences in the levels 8-oxodGuo in gills of *M. galloprovincialis*.

Table 2 shows the levels of lipid peroxidation in digestive glands, gills and mantle of mussels from the reference and contaminated sites. No statistical differences were observed in the levels of lipid peroxidation between digestive gland and gills of the mussels, respectively from contaminated and reference sites. However, mussels from the contaminated site showed higher levels of lipid peroxidation in mantle tissue (15.5 ± 5.9 nmol of TBARs/mg tissue) than in mussels from the reference site (4.5 ± 1.9 nmol of TBARs/mg tissue). It has been demonstrated that digestive gland and mantle tissues possess higher levels of polyunsaturated fatty acids (PUFA) than gills, and that the digestive gland contains higher amounts of lipophilic antioxidants than mantle tissue (Ribera *et al.* 1991). This hypothesis could explain the fact that only mantle tissues from the mussels kept at the contaminated site showed elevated levels of lipid oxidation products. The high antioxidant levels in the digestive gland could account for the lack of significant differences in the lipid peroxidation levels observed in this tissue.

Data presented here indicate that DNA and lipid damage levels in mussels *Perna perna* are affected after 12 months exposure to urban contamination. As the collections were carried out in the summer, which corresponds to the major tourist activity in Florianópolis city, augmented drainage of the urban wastewater to the contaminated site could account for some of the observed differences. A seasonal study needs to be done

Table 2. Levels of TBARS in digestive glands, gills and mantle tissues of mussels from the polluted and reference sites. Values are expressed in nmoles of TBARS/g of tissue.

Tissue	Reference	Contaminated
Digestive glands	6.5 ± 1.8 (9)	4.6 ± 2.9 (10)
Gills	4.3 ± 2.3 (10)	3.2 ± 0.9 (10)
Mantle tissues	4.5 ± 1.9 (10)	* 15.5 ± 5.9 (10)

* Statistical differences ($p < 0.05$). Numbers in parenthesis indicates the number of samples analyzed.

to clarify whether these changes occurs throughout the year.

Acknowledgments. This work was supported by the “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo”, FAPESP, (Brazil), the “Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico”, CNPq (Brazil), and the “Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência”, PRONEX/FINEP (Brazil). E.A.A. is a recipient of FAPESP fellowships. Dr. A.P.M.L. is a recipient of Post-Doc FAPESP fellowships.

REFERENCES

- Akcha F, Ruiz S, Zampieron C, Venier P, Burgeot T, Cadet J, Narbonne JF (2000) Benzo[a]pyrene-induced DNA damage in *Mytilus galloprovincialis*: measurement of bulky DNA adducts and DNA oxidative damage in terms of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine formation. *Biomarkers* 5: 355-367
- Beckman KB, Saljoughi S, Mashiyama ST, Ames BN (2000) A simpler, more robust method for the analysis of 8-oxoguanine in DNA. *Free Rad Biol Med* 29: 357-367
- Bainy ACD, Almeida EA, Müller IC, Ventura EC, Medeiros ID (2000) Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Mar Environ Res* 50: 411-416
- Benato VS (1999) Produtos químicos descartados no mar de Florianópolis e pesquisa de metais pesados em tecido muscular de tainhoa e parati (Gênero Mugil), PhD Thesis, Federal University of Santa Catarina, 98 pp
- Canova S, Degan P, Peters LD, Livingstone DR, Voltan R, Venier P (1998) Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. *Mutat Res* 399: 17-30
- Cerutti RL (1996) Contribuição ao conhecimento da poluição doméstica na Baía Norte, área da Grande Florianópolis, SC, PhD Thesis, Federal University of Santa Catarina, 129 pp
- Fiala ES, Conaway CC, Mathis JE (1999) Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane. *Cancer Res* 49: 5518-5522
- Ghatak S, Ho S (1996) Age related changes in the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation status in ventral and dorsolateral prostate lobes of noble rats. *Biochem Biophys Res Commun* 222: 362-367
- Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, Walter PB, Woodal AA, Yeo HC, Ames BN (1998) DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci* 95: 288-293

- Laws GM, Adams SP (1996) Measurement of 8-OHdG in DNA by HPLC/ECD: The importance of DNA purity. *BioTechniques* 20: 36-38
- Livingstone DR (2001) Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull* 42: 656-666
- Livingstone DR, Pipe RK (1992) Mussels and environmental contaminants: molecular and cellular aspects. In: Grosling E (ed) *The Mussel *Mytilus edulis*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*. Elsevier, Amsterdam, p 425-464
- Mallins DC, Haimanot R (1990) 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine, 9-hydroxyguanine and 8-hydroxyadenine in DNA from neoplastic liver of English sole exposed to carcinogens. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 614-619
- Pellerin-Massicote J (1994) Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *J Aquat Ecosyst Health* 3: 101-111
- Pozebon D (1998) Uso da vaporização eletrotérmica para a introdução de amostras no ICP-MS, PhD Thesis, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil, 165pp
- Ribera D, Narbonne JF, Michel X, Livingstone DR, O'hara S (1991) Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comp Biochem Physiol* 100: 177-181
- Rodríguez-Ariza A, Alhama J, Díaz-Méndez FM, López-Barea J (1999) Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of Sparatus fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution. *Mut Res* 438: 97-107
- Steinert SA (1999) DNA damage as a bivalve biomarker. *Biomarkers* 4: 492-496
- Torres MA, Testa CP, Gáspari C, Masutti MB, Panitz CMN, Curi-Pedrosa R, Almeida EA, Di Mascio P, Filho DW (2002) Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar Pollut Bull* 44: 923-932
- Wang L, Hirayasu K, Ishizawa M, Kobayashi Y (1994) Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nuc Acids Res* 22: 1774-1775

DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*

Eduardo Alves de Almeida^a, Sabrina de Almeida Marques^a, Clécio Fernando Klitzke^a,
Afonso Celso Dias Bainy^b, Marisa Helena Gennari de Medeiros^a, Paolo Di Mascio^a,
Ana Paula de Melo Loureiro^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26.077, Av. Prof. Lineu Prestes 748, São Paulo, SP, CEP 05513-970 Brazil

^bDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

Received 11 March 2003; received in revised form 26 May 2003; accepted 27 May 2003

Abstract

Data concerning the susceptibility of DNA to damage by reactive oxygen and nitrogen species and other endogenous compounds produced by physiological stress in marine organisms is lacking, especially in bivalve mollusks. In this article, we analyzed the background levels of lipid peroxidation (malondialdehyde, MDA), 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) and 1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine (1,*N*²-*ed*Guo) in digestive gland and mantle tissue of mussels *Perna perna* collected at a cultivation zone in Florianópolis (Santa Catarina, Brazil). The present data point to the possibility of the use of both 8-oxodGuo and 1,*N*²-*ed*Guo as complementary indicators of oxidative stress processes in mussels. A sensitive method coupling high performance liquid chromatography to mass spectrometry was applied for the detection of 1,*N*²-*ed*Guo in mussel tissues.

© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: DNA damage; 8-oxodGuo; Etheno adduct; Lipid peroxidation; Mussel; Oxidative stress; *Perna perna*; Mass spectrometry; HPLC

1. Introduction

Reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) are continuously generated in biological systems as by-products of oxidative metabolism. A failure to remove these ROS/RNS by antioxidant defense mechanisms can result in damage to key macromolecules, in particular DNA, lipids and proteins (Lemaire and Livingstone, 1993; Halliwell, 1993).

The maintenance of DNA integrity is of paramount importance to all organisms. For this reason, living organisms possess very efficient and intricate mechanisms for the protection of their genetic material. Significant stress eventually results in the dysfunction of these mechanisms and an increase in DNA damage occurs (Steinert, 1999). Thus, the assessment of such DNA lesions in organisms could improve fundamental information about their physiological status.

Much work has been focused on DNA damage as a consequence of DNA susceptibility to ROS/RNS. The oxidation of DNA can produce a number of different modified bases, including 8-oxo-7,8-

*Corresponding author. Tel.: +55-11-3091-2153; fax: +55-11-3091-2186.

E-mail address: anapaula@iq.usp.br (A.P. de Melo Loureiro).

dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo, Fig. 1) (Wiseman and Halliwell, 1996; Ravanat et al., 2000), often measured as an index of oxidative DNA damage in mammalian organisms. The 8-oxodGuo lesion is normally assessed as a marker of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) attack to DNA (Dizdaroğlu et al., 1991; Lemaire and Livingstone, 1993; Burcham, 1999) and can lead to misreading and GC $\rightarrow$ TA transversion (Kuchino et al., 1987).

Despite indications of the occurrence of 8-oxodGuo in DNA as a potential marker of stress response in several organisms, information about oxidative DNA damage in marine invertebrates are limited (Mallins and Haimanot, 1990; Marsh et al., 1993; Canova et al., 1998; Rodríguez-Ariza et al., 1999). Yet, the levels of membrane lipid oxidation by ROS/RNS, which lead to the formation of fatty acid hydroperoxides and other reactive products, including a wide range of aldehydes, have been largely measured in invertebrates, as indicators of injury caused by oxidative stress (Pellerin-Massicotte, 1994). Among these aldehydes, malondialdehyde (MDA) and *trans*-4-hydroxy-2-nonenal (HNE) have been suggested to play a major role in toxicity associated with lipid peroxidation (Cheeseman, 1993; Burcham, 1999; Nair et al., 1999).

In vitro studies have shown that oxidized α,β -unsaturated aldehydes react with 2'-deoxyguanosine (dGuo) residues generating the etheno DNA adduct 1, N^2 -etheno-2'-deoxyguanosine (1, N^2 - ϵ dGuo), as shown in Fig. 1 (Sodum and Chung, 1988; Loureiro et al., 2000). The role of DNA etheno adducts in mutagenic and carcinogenic processes triggered by known occupational and environmental carcinogens, such as vinyl chloride and ethyl carbamate, has been well investigated (Foiles et al., 1993; Bartsch et al., 1994). It has been shown that some of these lesions accumulate in DNA after chronic carcinogen exposure, leading to miscoding upon replication or transcription (Svenberg et al., 1992). 1, N^6 -Etheno-2'-deoxyadenosine (ϵ dAdo), 3, N^4 -etheno-2'-deoxycytidine (ϵ dCyd) and N^2 ,3-ethenoguanine (N^2 ,3- ϵ G) have been detected in different tissues of vinyl chloride exposed rats (Eberle et al., 1989; Ciroussel et al., 1990). Interestingly, etheno adducts have also been detected as background lesions in tissues of rodents and humans not exposed to carcinogens (Chung et al., 1996; Loureiro et al., 2002). In vitro studies have shown that 1, N^6 -ethenoadenine (ϵ A) and 3, N^4 -ethenocytosine (ϵ C) are formed by iron

mediated lipid peroxidation in rat liver microsome incubation mixtures containing nucleosides or nucleotides (el Ghissassi et al., 1995). Elevated levels of ϵ dAdo and ϵ dCyd adducts, probably due to excessive generation of lipid peroxidation products, were observed in liver DNA of a Long-Evans-Cinnamon rat strain that accumulates copper in the liver (Nair et al., 1996).

There are no reports of etheno DNA adducts detection in mussels, despite some of these lesions have largely been assessed in mammals (Nair et al., 1996, 1999). In this article, we apply our recently improved methodology, coupling high performance liquid chromatography to electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC/ESI/MS-MS) (Loureiro et al., 2002) for the detection of 1, N^2 - ϵ dGuo in digestive gland and mantle tissue of mussels. This assay opens new perspectives for the use of 1, N^2 - ϵ dGuo as an indicator of oxidative stress in marine organisms. Also, we evaluated the levels of 8-oxodGuo and MDA in the same mussels as additional indicators of tissue injury.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

All reagents used in this work were of the highest purity grade. Sucrose, MgCl_2 , desferoxamine, EDTA, RNase A, RNase T1, proteinase K, NaI, sodium acetate, sodium phosphate, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, 2'-deoxyguanosine and malondialdehyde bis[dimethylacetal] were obtained from Sigma chemical company (St. Louis, MO). Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), nuclease P1 and alkaline phosphatase were purchased from Amersham Pharmacia Biotech Inc. (NJ, USA). Triton X-100 was from Union Carbide Company. [$^{15}\text{N}_5$]2'-Deoxyguanosine was provided by Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). Isopropanol, ethanol, methanol, acetonitrile, chloroacetaldehyde and formic acid were from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Collection of mussels

Ten mussels *Perna perna* of similar length (8–10 cm) were purchased from a mussel farm located at Sambaqui beach (Florianópolis, Santa Catarina, Brazil); their digestive glands and mantle tissues

ugation at $5000 \times g$ for 15 min and washed with 3 ml of isopropanol 60%, followed by 3 ml of ethanol 70%. After additional centrifugation at $5000 \times g$ for 15 min, the DNA pellet was solubilized in 300 μ l of desferoxamine (0.1 mM). The DNA concentration was measured spectrophotometrically at 260 nm. DNA (100 μ g) was diluted in 200 μ l of deionized water, followed by the addition of 4 μ l of 1 M sodium acetate buffer (pH 5.5) plus 5 units of nuclease P1, and incubated at 37 °C for 30 min. A total of 20 μ l of 1 M Tris–HCl buffer (pH 7.4) and 2 units of calf intestinal alkaline phosphatase were then added, followed by 1 h incubation at 37 °C according to Fiala et al. (1999). Chloroform was then added (1:1 vol), the samples were centrifuged and the aqueous layer collected for the analyses.

2.4. Analysis of 8-oxodGuo by HPLC coupled to electrochemical detection

The amount of 8-oxodGuo was measured by high performance liquid chromatography coupled to electrochemical detection (HPLC/ECD) using a Shimadzu model LC-10AD pump with a Phenomenex Spherex 5 C18 column (250 $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μ m particle size), a Shimadzu SPD-10A UV detector at 254 nm and an electrochemical coulometric detector (ESA *Coulochem II*, Massachusetts, USA) with potentials set at 120 and 280 mV in electrodes 1 and 2, respectively (Rodríguez-Ariza et al., 1999; Laws and Adams, 1996; Beckman et al., 2000). A Shimadzu Class-LC10 software was used to calculate the peak areas. The mobile phase consisted of potassium phosphate buffer (0.05 M, pH 5.5) containing 8% methanol pumped at a flow rate of 1 ml/min. The amount of dGuo in the hydrolysates was simultaneously quantified by an UV detector, set at 254 nm.

2.5. Synthesis of [$^{15}\text{N}_5$]1, N^2 - ϵ dGuo internal standard

[$^{15}\text{N}_5$]1, N^2 - ϵ dGuo was obtained by reacting [$^{15}\text{N}_5$]dGuo with chloroacetaldehyde, with subsequent purification by HPLC, as described by Loureiro et al. (2000). The identity of the [$^{15}\text{N}_5$]-adduct was confirmed by mass spectrometry analysis.

2.6. Enzymatic hydrolysis of DNA for detection of 1, N^2 - ϵ dGuo

Six microliters of 1 M sodium acetate buffer (pH 5) and 1.5 pmol of the [$^{15}\text{N}_5$]1, N^2 - ϵ dGuo internal standard were added to an aliquot solution

containing 300 μ g of DNA, followed by digestion with 3 units of nuclease P1 at 37 °C for 30 min. 18 μ l of 1 M Tris–HCl buffer (pH 7.4), 18 μ l of phosphatase buffer and 9 units of alkaline phosphatase were then added for an additional 1-h incubation at 37 °C. The final volume of the solution was adjusted to 300 μ l. The enzymes were precipitated by the addition of chloroform and the resulting samples subjected to analysis (200 μ l of the DNA solution *per* injection). The following HPLC system was used to quantitatively determine dGuo in the DNA hydrolysates: a Luna C18 (2) (250 $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μ m) analytical column (Phenomenex, Torrance, CA) was eluted with a gradient of water and acetonitrile (from 0 to 5 min, 5% acetonitrile; from 5 to 30 min, 5–20% acetonitrile) at a flow rate of 1 ml/min, and the absorbance was monitored at 254 nm. A standard calibration curve prepared within the range of dGuo expected to be present in the DNA hydrolysates was used for this quantification.

2.7. Quantitation of 1, N^2 - ϵ dGuo by mass spectrometry

Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC/ESI/MS-MS) analyses in the positive mode were carried out on a Quatro II mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK). The 1, N^2 - ϵ dGuo adduct in DNA samples was detected by multiple-reaction monitoring (MRM), according to Loureiro et al. (2002). Briefly, a Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) consisting of an autosampler (SIL-10AD/VP), an automated switching valve (FCV-12AH), two pumps (LC 10AD-VP), an SPD-10AV/VP UV detector controlled by a communication bus module (SCL-10A/VP-CBM 10A) and Class-VP software were used for sample injection and clean-up of the analytical column (Luna C18(2) 250 $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μ m, Phenomenex). The adduct was eluted from this first column with a gradient of formic acid (0.1% in water) and acetonitrile. The DNA bases were carried to the discard until the time just before the elution of the adduct. At this time, the switching valve was changed and the adduct was carried through a second column (C18(2) Phenosphere-Next 150 $\times$ 2 mm i.d., 3 μ m, Phenomenex) to the mass spectrometer. A third HPLC pump was used simultaneously to load this second column with an isocratic flow (0.05 ml/min) of a (50:50) solution

Table 1

Levels of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo), malondialdehyde (MDA) and 1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine (1,*N*²- ϵ dGuo) in digestive gland (DG) and mantle tissue of mussels

Tissue	8-oxodGuo/10 ⁶ dGuo	MDA (nmol/g tissue)	1, <i>N</i> ² - ϵ dGuo/10 ⁷ dGuo
DG	30.80 ± 8.59 <i>n</i> = 10	41.39 ± 11.56 <i>n</i> = 8	5.26 ± 0.96 <i>n</i> = 10
Mantle	51.44 ± 19.62 <i>n</i> = 6	89.63 ± 21.67 ^a <i>n</i> = 8	15.53 ± 7.18 ^a <i>n</i> = 7

n = number of samples.

^a Statistical difference (*P* < 0.05) between both tissues using independent two population Student's *t*-test.

of formic acid 0.1% in water:acetonitrile, maintaining a constant flow of the mobile phase to the mass spectrometer (further information see Louriéro et al., 2002).

The DNA hydrolysates containing 1 pmol of the [¹⁵N₅]1,*N*²- ϵ dGuo internal standard were injected into the described system. The *m/z* 292 → 176 (1,*N*²- ϵ dGuo) and 297 → 181 ([¹⁵N₅]-1,*N*²- ϵ dGuo) [M+H]⁺ transitions were monitored with a dwell time of 1 s. The cone voltage was kept at 15 V. The collision energy was set at 10 eV. The pressure of the collision gas (argon) in the gas cell was adjusted to 6.7 × 10⁻⁴ mbar. The source temperature was held at 100 °C, and flow rates of drying and nebulizing gas (nitrogen) were optimized at 350 and 10 l/h, respectively. The capillary and HV electrode potentials were set at 3.10 and 0.30 kV, respectively. All the other parameters of the mass spectrometer were adjusted for acquisition of the best [M+H]⁺ → [M+H - 2-D-erythro-pentose]⁺ transition. The data were processed using MassLynx 3.2 software (Micromass). The calibration curve for quantitation of the adduct was constructed by plotting the peak area ratios of 1,*N*²- ϵ dGuo to [¹⁵N₅]1,*N*²- ϵ dGuo against the amount (fmol) of the 1,*N*²- ϵ dGuo adduct injected.

2.8. Evaluation of MDA levels

The levels of MDA in tissues were quantified as described by Hong et al. (2000). In brief, tissues were homogenized in 2 ml of mobile phase (potassium phosphate dihydrogen 50 mM, pH 7.0, methanol 1%). The same volume of acetonitrile was added to the homogenate, and thus the solution was centrifuged for 10 min at 5000 × *g* and 4 °C. Twenty microliters of the supernatant fraction were directly injected into the column (Supelcosil LC 18, 250 × 4.6 mm, 5 μm particle size, Supelco) through a Rheodyne injector (Cotati, CA). The HPLC apparatus was the same as described in

item 2.4. The MDA peak was monitored at 267 nm and quantified based on an authentic standard calibration curve.

2.9. Statistical analysis

The statistical comparisons were carried out using independent two population Student's *t*-test and one-way analysis of variance. Results are presented as mean ± S.D. Differences were considered significant when *P* < 0.05 was obtained.

3. Results

Table 1 shows the levels of 8-oxodGuo, MDA and 1,*N*²- ϵ dGuo in digestive gland and mantle tissue of mussels. Collected mussels showed 30.80 ± 8.59 residues of 8-oxodGuo/10⁶ dGuo in digestive gland and 51.44 ± 19.62 residues of 8-oxodGuo/10⁶ dGuo in mantle tissue. In addition, the levels of MDA in digestive gland and mantle tissue were 41.39 ± 11.56 and 89.63 ± 21.67 nmol/g of tissue, respectively.

The etheno adduct 1,*N*²- ϵ dGuo was analyzed and quantified by LC/ESI/MS-MS as described in Section 2. Fig. 2 presents the mass spectra of 1,*N*²- ϵ dGuo and [¹⁵N₅]1,*N*²- ϵ dGuo standards, showing the molecular ions for the 1,*N*²- ϵ dGuo (*m/z* = 292) and the fragment corresponding to the loss of the 2-deoxyribose (dR) moiety (*m/z* = 176), as well as for the labeled internal standard (*m/z* = 297 for the [M+H]⁺ and *m/z* = 181 for the [M+H - dR]⁺). MRM experiments were used for the detection of *m/z* 292 → 176 and *m/z* 297 → 181 transitions for the 1,*N*²- ϵ dGuo adduct and the [¹⁵N₅]-labeled internal standard, respectively, in digestive gland and mantle tissue of the mussel *P. perna*, as indicated in Fig. 3. With this approach, the levels of 1,*N*²- ϵ dGuo were determined in mussel tissues with a detection limit of approximately 20 fmol. As shown in Table 1, the levels

Fig. 2. Full scan spectra of 1,N²-εdGuo (a) and [¹⁵N₅]-1,N²-εdGuo (b). The labeled nitrogen atoms in the molecule are indicated with an asterisk. dR = 2-deoxyribose.

of this lesion were also higher in the mantle tissue (15.53 ± 7.18 adducts/ 10^7 dGuo) than in the digestive gland (5.26 ± 0.96 adducts/ 10^7 dGuo).

4. Discussion

The results presented here indicate a more accentuated oxidative damage in mantle tissue than in digestive gland. As mussels were collected in early autumn, the high level of damage in mantle tissue could be associated to the already described high gametogenesis activity of mussel *P. perna* during this season, with concomitant increase in the level of stored lipids and metabolic activity in this tissue (Magalhães, 1998; Wilhelm Filho et al., 2001; Honkoop and van der Meer, 1998). In addition to this, the digestive gland usually pres-

ents higher amounts of lipophilic antioxidants than the mantle tissue (Ribera et al., 1991), which can also explain the observed differences in the oxidative stress between both tissues.

Interestingly, although the MDA levels were similar to those detected in mammalian organisms (Ghatak et al., 1996), mussels showed higher levels of 8-oxodGuo than those commonly observed in mammals, as previously reported (Mitchellmore et al., 1996). Accordingly, Mallins and Haimanot (1990), Marsh et al. (1993), Canova et al. (1998) and Rodríguez-Ariza et al. (1999) also observed higher levels of 8-oxodGuo in mussels (varying from 70 to 250 residues of 8-oxodGuo/ 10^6 dGuo) and fishes (30–300 residues of 8-oxodGuo/ 10^6 dGuo) than those observed in main mammal models (0.8–12 residues of 8-

Fig. 3. Detection of 1, N^2 - ϵ dGuo formed in DNA of mantle tissue of the mussel *P. perna* by HPLC/ESI/MS-MS analysis in the MRM mode. (a) adduct 1, N^2 - ϵ dGuo present in the sample. (b) 1 pmol of [$^{15}\text{N}_5$]1, N^2 - ϵ dGuo internal standard.

oxodGuo/ 10^6 dGuo, according to Matos et al., 2001; Cadet et al., 2002). As the method used for DNA extraction is the same as that used by Matos et al., 2001, the artefactual oxidation of DNA due to the methodological approach cannot be considered here. We need to take into account that marine bivalves bioaccumulate several toxicants and this can contribute to the observed major levels of 8-oxodGuo in these organisms.

However, the levels of 1, N^2 - ϵ dGuo observed in the digestive gland were in accordance to those observed in mammals, although the levels observed in the mantle tissue were higher (Loureiro et al., 2002). We could also observe a correlation between 1, N^2 - ϵ dGuo formation and the occurrence of lipid peroxidation, since higher DNA adduct levels were observed in mantle tissue, when compared to DG.

This is the first report of detection of an etheno adduct in a marine organism. The development of a sensitive technique based on HPLC/ESI/MS-MS allows the detection of this lesion in vivo, opening new perspectives for its use in experiments that lead marine organisms to an oxidative stress condition. As 1, N^2 - ϵ dGuo is formed by the reaction of dGuo with lipid peroxidation products, complementary analyses of both adduct and lipid peroxidation levels in the same organism could best supply the discussion of results.

The main data on DNA adducts in marine organisms are concerned with products formed by reaction of DNA bases with external xenobiotic

compounds. The adduct 1, N^2 - ϵ dGuo is formed by endogenous secondary products of lipid peroxidation, which could be enhanced in stress situations that are not only necessarily related to environmental pollution, but also to natural stress, such as desiccation, variation of oxygen availability, salinity, pH and temperature or physiological stress occasioned by numerous diseases or predation.

Acknowledgments

This work was supported by the 'Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo', FAPESP, (Brazil), the 'Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico', CNPq (Brazil), and the 'Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência', PRONEX/FINEP (Brazil). E.A.A. and S.A.M. are recipients of FAPESP fellowships. Dr Ana Paula M. Loureiro is a recipient of Post-Doc FAPESP fellowship.

References

- Bartsch, H., Barbin, A., Marion, M.J., Nair, J., Guichard, Y., 1994. Formation, detection and role in carcinogenesis of etheno bases in DNA. *Drug Metab. Rev.* 26, 349–371.
- Beckman, K.B., Saljoughi, S., Mashiyama, S.T., Ames, B.N., 2000. A simpler, more robust method for the analysis of 8-oxoguanine in DNA. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 357–367.
- Burcham, P.C., 1999. Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism. *Mutat. Res.* 443, 11–36.

- Cadet, J., Douki, T., Frelon, S., Gasparutto, D., Ravanat, J.-L., Sauvaigo, S., Martinez, G.R., Medeiros, M.G.H., Di Mascio, P., 2002. Oxidative damage to DNA: formation and measurement. In: Pasquier C. (Ed.), Proceedings of the 11th Conference of SFRRI, Paris, Monduzzi Editore, S.P.A. Bologna, Italy, pp. 129–135.
- Canova, S., Degan, P., Peters, L.D., Livingstone, D.R., Voltan, R., Venier, P., 1998. Tissue dose, DNA adducts oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. *Mutat. Res.* 399, 17–30.
- Cheeseman, K.H., 1993. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol. Aspects Med.* 14, 191–197.
- Chung, F.L., Chen, H.C.J., Nath, R.G., 1996. Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis* 17, 2105–2111.
- Ciroussel, F., Barbin, A., Eberle, G., Bartsch, H., 1990. Investigations on the relationship between DNA ethenobase adduct levels in several organs of vinyl chloride-exposed rats and cancer susceptibility. *Biochem. Pharmacol.* 39, 1109–1113.
- Dizdaroglu, M., Rao, G., Halliwell, B., Gajewski, E., 1991. Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. *Arch. Biochem. Biophys.* 285, 317–324.
- Eberle, G., Barbin, A., Laib, R.J., Ciroussel, F., Thomale, J., Bartsch, H., et al., 1989. 1,N⁶-Etheno-2'-deoxyadenosine and 3,N⁴-etheno-2'-deoxycytidine detected by monoclonal antibodies in lung and liver DNA of rats exposed to vinyl chloride. *Carcinogenesis* 10, 209–212.
- el Ghissassi, F., Barbin, A., Nair, J., Bartsch, H., 1995. Formation of 3,N⁴-ethenocytosine by lipid peroxidation products and nucleic acid bases. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 278–283.
- Fiala, E.S., Conaway, C.C., Mathis, J.E., 1999. Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane. *Cancer Res.* 49, 5518–5522.
- Foiles, P.G., Miglietta, L.M., Nishikawa, A., Kusmirek, J.T., Singer, B., Chung, F.C., 1993. Development of monoclonal antibodies specific for 1,N²-ethenodeoxyguanosine and N²,3-ethenodeoxyguanosine and their use for quantitation of adducts in G12 cells exposed to chloroacetaldehyde. *Carcinogenesis* 14, 113–116.
- Ghatak, S., Ho, S.-mei, 1996. Age-related changes in the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation status in ventral and dorsolateral prostate lobes of noble rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222, 362–367.
- Halliwell, B., 1993. Oxidative DNA damage: meaning and measurement. In: Halliwell, B., Auroma, O.I. (Eds.), *DNA and Free Radicals*. Ellis Horwood, New York, pp. 67–79.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B., Shigenaga, M.K., Walter, P.B., Woodal, A.A., Yeo, H.C., et al., 1998. DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 288–293.
- Hong, Y.L., Yeh, S.L., Chang, C.Y., Hu, M.L., 2000. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clin. Biochem.* 33, 619–625.
- Honkoop, P.J.C., van der Meer, J., 1998. Experimentally induced effects of water temperature and immersion time on reproductive output of bivalves in the Wadden Sea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 220, 227–246.
- Kuchino, Y., Mori, F., Kasai, H., Iwai, S., Miura, K., Ohtsuka, E., et al., 1987. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and adjacent residues. *Nature* 327, 77–79.
- Laws, G.M., Adams, S.P., 1996. Measurement of 8-OHdG in DNA by HPLC/ECD: the importance of DNA purity. *Biotechniques* 20, 36–38.
- Lemaire, P., Livingstone, D.R., 1993. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. *Trends Comparat. Biochem. Physiol.* 1, 1119–1147.
- Loureiro, A.P.M., Di Mascio, P., Gomes, O.F., Medeiros, M.H.G., 2000. *trans*, *trans*-2,4-Decadienal-induced 1,N²-Etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 601–609.
- Loureiro, A.P.M., Marques, S.A., Garcia, C.C.M., Di Mascio, P., Medeiros, M.H.G., 2002. Development of an on-line liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry system to quantitatively determine 1,N²-etheno-2'-deoxyguanosine in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1302–1308.
- Magalhães, A.R.M. 1998. Efeito da parasitose por *Trematoda bucephalidae* na reprodução, composição bioquímica e índice de condição de mexilhões *Perna perna*. Doctorate Thesis. Instituto de Biociências, USP, São Paulo, SP, Brazil.
- Mallins, D.C., Haimanot, R., 1990. 4,6-Diamino-5-formamidopyrimidine, 9-hydroxyguanine and 8-hydroxyadenine in DNA from neoplastic liver of English sole exposed to carcinogens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 614–619.
- Marsh, J.W., Chipman, J.K., Livingstone, D.R., 1993. Formation of DNA adducts following laboratory exposure of the mussel, *Mytilus edulis*, to xenobiotics. *Sci. Total Environ.* 208, 567–572.
- Matos, H.R., Capelozzi, V.L., Gomes, O.F., Di Mascio, P., Medeiros, M.H.G., 2001. Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitrilotriacetate. *Arch. Biochem. Biophys.* 396, 171–177.
- Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K., Garcia-Martinez, P., Lemaire, P., Peters, L.D., Livingstone, D.R., 1996. Normal status of hepatic 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity, antioxidant enzymes and DNA oxidation in turbot (*Scophthalmus maximus*) and other flatfish species following exposure to nitroaromatic compounds. *Mar. Environ. Res.* 42, 329–333.
- Nair, J., Barbin, A., Velic, I., Bartsch, H., 1999. Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. *Mutat. Res.* 424, 59–69.
- Nair, J., Sone, H., Nagao, M., Barbin, A., Bartsch, H., 1996. Copper-dependent formation of miscoding etheno-DNA adducts in the liver of Long-Evans-Cinnamon (LEC) rats developing hereditary hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 56, 1267–1271.
- Pellerin-Massicotte, J., 1994. Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *J. Aquat. Ecosys. Health* 3, 101–111.

- Ravanat, J.L., Di Mascio, P., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Cadet, J., 2000. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. *J. Biol. Chem.* 275, 40601–40604.
- Ribera, D., Narbonne, J.F., Michel, X., Livingstone, D.R., O'Hara, S., 1991. Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 177–181.
- Rodríguez-Ariza, A., Alhama, J., Díaz-Méndez, F.M., López-Barea, J., 1999. Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of Sparatus fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution. *Mutat. Res.* 438, 97–107.
- Sodum, R.S., Chung, F.L., 1988. 1,*N*²-ethenodeoxyguanosine as a potential marker for DNA adduct formation by *trans*-4-hydroxy-2-nonenal. *Cancer Res.* 48, 320–323.
- Steinert, S.A., 1999. DNA damage as a bivalve biomarker. *Biomarkers* 4, 492–496.
- Swenberg, J.A., Fedtke, N., Ciroussel, F., Barbin, A., Bartsch, H., 1992. Etheno adducts formed in DNA of vinyl chloride-exposed rats are highly persistent in liver. *Carcinogenesis* 13, 727–729.
- Wang, L., Hirayasu, K., Ishizawa, M., Kobayashi, Y., 1994. Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nucleic Acids Res.* 22, 1774–1775.
- Wilhelm Filho, D., Tribess, T., Gáspari, C., Cláudio, F.D., Torres, M.A., Magalhães, A.R.M., 2001. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture* 203, 149–158.
- Wiseman, H., Halliwell, B., 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 313, 17–29.

Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen ($O_2(^1\Delta_g)$) produces N^1 -acetyl- N^2 -formyl-5-methoxykynurenine

Abstract: It has been shown that melatonin exhibits antioxidant properties. Chemical structures of some of the products formed by the interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species have been elucidated. Despite some evidence that the reaction of melatonin with singlet molecular oxygen ($O_2(^1\Delta_g)$) produces N^1 -acetyl- N^2 -formyl-5-methoxykynurenine (AFMK), it has not been fully documented. In this investigation, melatonin was oxidized by photosensitization with methylene blue or by a clean chemical source of $O_2(^1\Delta_g)$, the thermodecomposition of N,N' -di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalenedipropanamide (DHPNO₂). The resulting product was characterized by high performance liquid chromatography, coupled to electrospray ionization mass spectrometry and also by 1H , ^{13}C and dept135 nuclear magnetic resonance spectroscopy. An isotopically labeled DHPN¹⁸O₂ was also prepared and used as a chemical source of labeled $^{18}O_2(^1\Delta_g)$ to unequivocally characterize the end product. The results uncovered by this work confirm the hypothesis that oxidation of melatonin by $O_2(^1\Delta_g)$ produces AFMK.

Eduardo A. de Almeida, Glauca R. Martinez, Clécio F. Klitzke, Marisa H. G. de Medeiros and Paolo Di Mascio

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Key words: N^1 -acetyl- N^2 -formyl-5-methoxykynurenine, antioxidants, free radical, melatonin, singlet oxygen

Address reprint requests to Paolo Di Mascio, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, C.P. 26077-CEP 05513-970, São Paulo, Brazil. E-mail: pdmascio@iq.usp.br

Received March 18, 2003; accepted April 17, 2003.

Introduction

Melatonin (N -acetyl-5-methoxytryptamine), that is synthesized in the pineal gland from the monoamine serotonin, exhibits antioxidant properties [1–3]. Although the mechanisms of action of melatonin are not fully understood, investigators believe that the antioxidant properties of melatonin are not mediated by binding to its receptors, but rather by its ability to directly scavenge reactive oxygen and nitrogen species [4].

Determinations of chemical reactivity between melatonin and reactive oxygen species by spin trapping, in combination with electron paramagnetic resonance techniques, demonstrated a scavenging effect of melatonin on the superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet molecular oxygen ($O_2(^1\Delta_g)$) and the hydroxyl radical ($\cdot OH$) [5, 6]. Moreover, the products of the interaction of melatonin with $\cdot OH$, NO and H_2O_2 [cyclic 3-hydroxymelatonin, N -nitrosomelatonin and N^1 -acetyl- N^2 -formyl-5-methoxykynurenine (AFMK), respectively] have been identified by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC/MS), in combination with nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy [7–9].

It has been reported that melatonin protects neurons from $O_2(^1\Delta_g)$ -induced apoptosis [10]. Moreover, riboflavin, upon exposure to bright white light, catalyzes the formation of $O_2(^1\Delta_g)$, which is suppressed by melatonin [11]. Melatonin also reduces $O_2(^1\Delta_g)$ -dependent 2,2,6,6-tetramethylpiperidine oxide radical generation during rose bengal photoexcitation [6]. These findings are consistent with the observations that melatonin reduces the cytotoxicity caused by $O_2(^1\Delta_g)$. However, the product formed by the reaction of

melatonin with this reactive specie is not well described, although some evidence indicates that the end product may be AFMK. Andrisano et al. [12] reported that photodegradation of melatonin produced AFMK as the main product. In addition, Lu et al. [13] indicated that the reaction of melatonin with $O_2(^1\Delta_g)$ is chemiluminescent, which results from the opening of the indole ring of melatonin when it reacts with $O_2(^1\Delta_g)$, thus forming AFMK.

In this work, new evidence is provided in support that AFMK is the end product when $O_2(^1\Delta_g)$ reacts with melatonin. The product was characterized by HPLC coupled with an electrospray ionization (ESI) MS and by 1H , ^{13}C and dept135 NMR spectroscopy experiments. A water-soluble naphthalene endoperoxide acted as a chemical source of $O_2(^1\Delta_g)$ and labeled $^{18}O_2(^1\Delta_g)$ (Scheme 1) was also synthesized and used to access the reactivity of $O_2(^1\Delta_g)$ toward melatonin.

Scheme 1. Generation of singlet molecular oxygen ($O_2(^1\Delta_g)$) by the thermodecomposition of DHPNO₂.

Material and methods

Chemicals

Melatonin, Chelex® 100 chelating resin, sodium bicarbonate and deuterated water were purchased from Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO, USA). Methanol, methylene blue, 1,4-dimethylnaphthalene, bromine, chloroform, diethyl malonate, sulfuric acid, ethanol, toluene, 1-amine-1,2-propanediol, benzene and deuterated chloroform were from Merck KgaA (Darmstadt, Germany). Acetone was obtained from Labsynth Ltda (São Paulo, Brazil). Water used in all experiments was purified with a Millipore Milli-Q system (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA).

Light-dependent oxidation of melatonin

Melatonin was directly photosensitized in 2 mL of water (1 mM final concentration) and in 2 mL of methanol (21 mM final concentration), containing 20 μ L of a 6 mg/mL of methylene blue (MB) solution. The solutions were then exposed to a 500 W tungsten lamp for 3 hr at 4°C and oxygen was boiled into the solution. After this procedure, MB was extracted with Chelex® 100 cation-exchange resin and the solution was filtered through a polymeric membrane (0.45 μ m). The filtered solution was stored at 4°C, until analysis.

For a kinetic study of melatonin consumption, small aliquots (20 μ L) of the solutions were collected during the photosensitization period, at 10-min intervals. These aliquots were examined by HPLC.

Synthesis of the endoperoxide of *N,N'*-di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalenedipropanamide as a clean source of labeled singlet oxygen

N,N'-di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalenedipropanamide (DHPN) was synthesized as previously described by Martinez et al. [14]. In the first step, a double radicalar bromination of 1,4-dimethylnaphthalene, in the presence of light, yields 1,4-dibromomethylnaphthalene, which was purified by recrystallization in chloroform. Thereafter, 1,4-naphthalenedipropanoic acid (NDPA) was obtained by a malonic synthesis, hydrolysis, and decarboxylation [15]. NDPA was subsequently used for the synthesis of diethyl-1,4-naphthalenedipropanoate (DENDP) by acid-catalyzed esterification. This was achieved by refluxing 21 g (77 mmol) of NDPA and 1 mL of H₂SO₄ (95%) in ethanol for 2 hr. A Dean–Stark trap was settled in the presence of toluene and the reflux was left for 4 hr. The organic phase was washed with 5% aqueous NaHCO₃, dried and evaporated to yield DENDP as an oil. Finally, the amidation of the diester DENDP with 3-amino-1,2-propanediol was synthesized by stirring, under reflux, in methanol for 24 hr. After the evaporation of the solvent, the residue was triturated with 100 mL of acetone. The precipitate was filtered and recrystallized in methanol, yielding 50% DHPN.

N,N'-di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalenedipropanamide endoperoxide was prepared by photosensitization in MB, in presence of oxygen. DHPN (210 mg) was diluted in 2.5 mL of deuterated water that contained 0.5 mg of MB.

Thereafter, the solution was maintained under continuous stirring in an atmosphere of O₂ and was cooled at 4°C and irradiated for 6 hr with a 500 W tungsten lamp, placed at a distance of 30 cm. Then, Chelex® 100 cation-exchange resin was added to the blue mixture and stirred for 20 min at 4°C for complete fixation of the sensitizer onto the insoluble anionic polymer. Using a 5 mL syringe, the solution was passed through a polymeric membrane (0.45 μ m) and the filtrate was stored at –80°C for further use. The residual blue resin was washed with 1 mL of cold deuterated water to remove the remaining endoperoxide product. The concentration (130 mM) and the yield of the endoperoxide DHPNO₂ formation (close to 95%) was determined using UV spectroscopy. Alternatively, ¹⁸O-labeled DHPN¹⁸O₂ was also synthesized. The solution, maintained in the dark, was purged several times with argon before photosensitization. An ¹⁸O₂ cylinder was connected to the system, which was photosensitized as described above.

Oxidation of melatonin by the DHPNO₂ system

Melatonin was dissolved (close to 2 mM) in 1 mL of water containing 10 mM DHPNO₂. The solution was then incubated at 37°C and small aliquots (10 μ L) of the solution were collected at 15-min intervals, in order to obtain a kinetic curve of melatonin consumption. After 2 hr, the solution was frozen for further analysis.

High performance liquid chromatography analyses

The HPLC system consisted of two LC-10ADVP pumps, an SCL-10A system controller and an SPD-M10AVP photodiode-array detector (Shimadzu, Kyoto, Japan), with wavelength ranging from 370 to 200 nm, and monitored by Class-VP 6.12 software. For qualitative analysis an analytic Supelcosil LC-18 column (150 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m particle size) was used. The mobile phase was a gradient of 20–40% methanol in water for 20 min, and 40–20% during an additional 5 min, at a flow rate of 1 mL/min. For purification of the product, a semi-preparative Luna 10 C-8 (2) column (250 $\times$ 10 mm, 10 μ m particle size) was utilized, with the same gradient, at a flow rate of 4.7 mL/min.

Analysis by high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry

High performance liquid chromatography/ESI/MS analyses in the positive mode were carried out on a Quatro II mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK), which had the cone voltage and source temperature adjusted to 15 V and 100°C, respectively. The flow rates of the drying and nebulizing gas (N₂) were optimized at 300 and 15 L/h. The capillary potential and high electrode potential were set to 3.5 and 0.5 kV, respectively. The HPLC system was the same as described above, with a splitter connected between the HPLC apparatus and the MS, allowing the entry of a flow rate of 250 μ L/min into the MS. Full scan data were acquired over a mass range of 190–400 *m/z*. The data were processed and transformed into molecular mass values on a

mass scale, with Mass Lynx NT data system, version 3.2 (Micromass, Manchester, UK).

Nuclear magnetic resonance

After exhaustive collection by semi-preparative HPLC, the oxidative product of melatonin was dried in a Speed Vac® Plus Savant (Savant apparatus, New York, NY, USA) and the residue dissolved in 0.7 mL of deuterated chloroform and analyzed for ^1H -NMR in a Varian® 300 MHz (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) and ^{13}C and dept135 NMR in a Bruker® 500 MHz (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany) NMR spectrometer.

Results and discussion

For analytical purposes, photosensitization was first carried out for melatonin in water with the MB system, which is known to generate $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. MB can absorb light ($h\nu$) to produce MB in the singlet excited state ($^1\text{MB}^*$), leading to the triplet state ($^3\text{MB}^*$) by intersystem crossing (ISC) (reaction 1). Then $^3\text{MB}^*$ transfers its energy to the triplet ground state of molecular oxygen ($\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$) generating $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (reaction 2) [17].

Figure 1A shows the kinetic profile of this photo-oxidation as a function of the light irradiation time. As shown, practically all melatonin was consumed after 40 min of photosensitization and one main product was formed, as indicated by the HPLC analyses (Fig. 2A). This product showed substantial absorbance in the range of 320–380 nm, although melatonin did not absorb above a wavelength of 320 nm (Fig. 2C,D).

Recently, Tan et al. [9] described that oxidation of melatonin by H_2O_2 gives the product AFMK, which presented high absorption in the range of 320–380 nm. Whereby oxidation of melatonin by $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ could produce the same compound, as previously proposed [12, 13].

Figure 3 shows the mass spectra of both the melatonin standard and the product formed after photosensitization, showing main signals at $m/z = 233$ and 265 for the $[\text{M} + \text{H}]^+$ ions of each compound, respectively, and $m/z = 287$ for the $[\text{M} + \text{Na}]^+$ adduct of the photo-oxidative product. This result indicates the incorporation of two oxygen atoms into melatonin after photosensitization.

As described by Inoue et al. [16], the mechanism of photo-oxidation of some indoles by MB can proceed via the type II mechanism ($\text{O}_2(^1\Delta_g)$), whereas with a significant contribution of non- $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ mechanism (type I) [17]. If oxidation of melatonin proceeded by just type II photoreaction, where the photosensitizer transfers energy to oxygen generating $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, it could be unequivocally affirmed that the product was formed by interaction of melatonin and $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ only. However, if there was the participation of type I reactions, the reaction could involve the generation of free radicals and other excited species that would interfere with the oxidation process. To circumvent this

Fig. 1. Kinetic profile of the photo-oxidation of melatonin by the methylene blue system in water (A) or methanol (B), indicating the consumption of melatonin (●) and the formation of AFMK (○) at 275 nm.

Fig. 2. Profiles of the HPLC separation of melatonin (peak 2) from its respective oxidative product AFMK (peak 1), at 275 nm in the methylene blue system (A), and in the DHPNO₂ system (B). The UV spectra of melatonin (C) and the oxidative product AFMK (D) are shown. Peak 3 is DHPN.

problem, DHPNO₂ was used as a clean chemical source of $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (Scheme 1).

As described by Pierlot et al. [18], the thermodecomposition of naphthalene endoperoxides generates $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ in

Fig. 3. Mass spectra of the melatonin standard (A) and the product AFMK formed after photosensitization (B), in the positive electrospray ionization mode (ESI^+), with cone voltage and source temperature adjusted to 25 V and 80°C, respectively.

high yields. Studies with labeled $DHPN^{18}O_2$ have demonstrated the generation of $^{18}[O_2(^1\Delta_g)]$ with approximately 60% yield [14]. After incubation of melatonin with $DHPNO_2$ at 37°C, the formation of a product with the same HPLC retention time and UV spectra similar to the product obtained by the MB photosensitization system was observed (Fig. 2B). The analysis of the product by MS

revealed the same mass for the product ($m/z = 265$, data not shown), indicating that the product obtained by $DHPNO_2$ $O_2(^1\Delta_g)$ -generating system is the same as the one obtained by photosensitization. This represents an unequivocal indication that the product was generated by the interaction of melatonin and $O_2(^1\Delta_g)$ only, with no participation of other reactive specie.

When incubating melatonin with the labeled $DHPN^{18}O_2$, the incorporation of two labeled oxygen atoms into melatonin was expected, giving a main peak in MS at $m/z = 269$ ($[(M+4)+H]^+$). However, as shown in Fig. 4, after incubation of melatonin with $DHPN^{18}O_2$, a mixture of two main peaks at $m/z = 265$ and 267 and its respective sodium adduct ($m/z = 287$ and 289, respectively), was obtained.

Based on the literature, several compounds containing oxygen functional groups (mainly aldehydes, carboxylic acids and ketones) may show a high rate of oxygen exchange in water [19–21]. Thus, the observed peaks are probably associated with the exchange of the two labeled oxygen atoms of the product with that of water ($m/z = 265$ for $[M+H]^+$ and $m/z = 287$ for $[M+Na]^+$), or the exchange of only one labeled oxygen ($m/z = 267$ and 289, for $[(M+2)+H]^+$ and $[(M+2)+Na]^+$, respectively).

Nevertheless, these results support the conclusion that the product formed by the reaction of $DHPN^{18}O_2$ with melatonin was the same as that obtained when melatonin was oxidized in the MB system.

The next step was the oxidation of large amounts of melatonin by photosensitization, followed by its purification for final characterization by NMR spectroscopy. Because of the low solubility of melatonin in water, 50 mg of melatonin was photosensitized in methanol, although the yield of photosensitization in methanol was lower than in water (60–70% of all melatonin was consumed after 3 hr of photosensitization, as shown in Fig. 1B).

After exhaustive HPLC collection, the solution was dried and the product (10 mg) was dissolved in 0.7 mL of $CDCl_3$

Fig. 4. Mass spectra of the product formed after incubation of melatonin with labeled $DHPN^{18}O_2$, in the positive electrospray ionization mode (ESI^+), with cone voltage and source temperature adjusted to 25 V and 80°C, respectively.

Fig. 5. A 300 MHz ^1H -NMR spectra of the purified oxidative product, AFMK, of melatonin, in CDCl_3 .

for the ^1H , ^{13}C and dept135 NMR analyses. The obtained ^1H NMR spectra (Fig. 5) was an analog of the one obtained by Tan et al. [9], which corresponds to the product AFMK [δ (ppm, in CDCl_3): 11.19 (s), 8.66 (d, $J = 9$ Hz), 8.43 (s), 7.36 (d, $J = 3$ Hz), 7.13 (dd, $J = 9$ and 3 Hz), 6.02 (s), 3.82 (s), 3.63 (q, $J = 6$ Hz), 3.26 (t, $J = 6$ Hz), 1.97 (s) and 1.6 (s)]. The ^{13}C signals (Fig. 6A) were attributed by comparing with the ^{13}C NMR data obtained by Fang et al. [22] for the compound N^1 -acetyl- N^2 -formylkinurenine methyl ester and based on the typical signals described in the literature [δ (ppm, in CDCl_3): 203.8, 170.3, 159.5, 155, 133.4, 123.5, 122.7, 121, 115.8, 55.8, 39.7, 34.2 and 23.3]. Dept135 of AFMK was also performed (Fig. 6B) for best attribution of C, CH, CH_2 and CH_3 assignments [δ (ppm, in CDCl_3): 123.5 (CH), 121 (CH), 115.8 (CH), 55.8 (CH_3), 39.7 (CH_2), 34.2 (CH_2) and 23.3 (CH_3)].

The antioxidant properties attributed to melatonin has led to a vast number of studies which have clarified some of the multiple actions by which melatonin protects macromolecules from oxidative damage. Although some evidence elicited from the literature has indicated that interaction of melatonin with $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ produces AFMK, it was not well assured. Based on results presented in this work, it could be verified that the product formed is AFMK. Although oxidation of melatonin by H_2O_2 produces the same compound, the mechanisms of production of AFMK by the two reactive oxygen species are probably distinct. As

described by Tan et al. [9], oxidation of melatonin by H_2O_2 involves the formation of an epoxide that is hydrolyzed to a diol, followed by an opening of the indole ring, yielding AFMK. The mechanism of melatonin oxidation by $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, probably involves the formation of a dioxetane intermediate, which leads to the cleavage of the indole ring, so producing AFMK (Scheme 2).

Scheme 2. Proposed mechanism for melatonin oxidation by $^{18}\text{O}_2(^1\Delta_g)$.

Fig. 6. A 500 MHz ¹³C (A) and dept135 (B) NMR spectra of the purified oxidative product, AFMK, of melatonin, in CDCl₃.

Sources of O₂(¹Δ_g) in cells are varied, including reactions catalyzed by peroxidases (such as myeloperoxidase in phagocytic cells) or oxygenases, and lipid peroxidation [23, 24] and as a result of ultraviolet radiation (for a review, see Ref. [25]). Also, this reactive specie has been used in the treatment of cancer in photodynamic therapy, which involves the administration of certain porphyrin derivatives to cancer patients. These derivatives preferentially localize in the tumor cells, which are then exposed to visible light to generate O₂(¹Δ_g) and in turn damages the microvasculature of the tumor leading to cell death.

The deleterious effects of O₂(¹Δ_g) in cells could be counteracted by several antioxidant systems, including melatonin. The main evidence for this proposal is based on the work published by Cagnoli et al. [10], which added melatonin to cell cultures treated with rose bengal and

exposed to light. Both neuronal apoptosis and inhibition of creatine kinase activity were prevented by the addition of melatonin, indicating that melatonin overcame the photodynamic injury to neurons. However, at that time there was no direct evidence that melatonin would function as an O₂(¹Δ_g) quencher. Based on results presented here, it is documented that melatonin functions as an O₂(¹Δ_g) quencher producing AFMK as the final product, thus contributing to the understanding of mechanisms of the antioxidative properties of melatonin.

Kynurenines, such as AFMK, have been rarely investigated, and its physiologic functions and *in vivo* levels are essentially unknown (for a review, see Ref. [26]). Kynurenines and their metabolites are mainly produced and metabolized by several enzymes in organisms. Recently Silva et al. [27] described a myeloperoxidase-catalyzed oxidation

of melatonin producing AFMK (in the presence of H_2O_2) in activated neutrophils; they proposed that this process is involved in the modulation of biologically important cellular responses, although it remained to be tested. This proposal was based on works previously published by Cilento [28, 29], who first proposed the involvement of excited specie formed *in vivo* in biochemical systems.

If AFMK can be produced in cells by different enzymatic means and if its production through oxidation of melatonin regularly occurs *in vivo*, then the participation of reactive oxygen species such as H_2O_2 and $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ could also be important mediators of several responses in cells, as AFMK can be produced as a consequence of melatonin interaction with such reactive specie.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Brazilian entities FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, CNPq – Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico, PRONEX/FINEP – Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência, and the Pró-Reitoria de Pesquisa of USP – University of São Paulo. E.A. Almeida and G.R. Martinez are recipients of FAPESP fellowships.

References

1. TAN DX, CHEN LD, POEGGELER B et al. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; **1**:57–60.
2. REITER RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998; **56**:359–384.
3. REITER RJ, TAN D-X, MANCHESTER LC et al. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Cell Biochem Biophys* 2001; **34**:237–254.
4. ALLEGRA M, REITER RJ, TAN DX et al. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res* 2003; **34**:1–10.
5. MATUSZAK Z, RESZKA KJ, CHIGNELL CF. Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations. *Free Rad Biol Med* 1997; **23**:367–372.
6. ZANG LY, COSMA G, GARDNER H et al. Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1425**:467–477.
7. TAN D-X, MANCHESTER LC, REITER RJ et al. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of *in vivo* hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **253**:614–620.
8. TURJANSKI AG, LEONIK F, EESTRIN DA et al. Scavenging of NO by melatonin. *J Am Chem Soc* 2000; **122**:10468–10469.
9. TAN D-X, MANCHESTER LC, REITER RJ et al. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Rad Biol Med* 2000; **29**:1177–1185.
10. CAGNOLI CM, ABATAY C, KHARLANOVA E et al. Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J Pineal Res* 1995; **18**:222–226.
11. POEGGELER G, SAARELA S, REITER RJ et al. Melatonin – a highly potent endogenous scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole assessed *in vitro*. *Ann NY Acad Sci* 1994; **739**:419–420.
12. ANDRISANO V, BERTUCCI C, BATTAGLIA A et al. Photostability of drugs: photodegradation of melatonin and its determination in commercial formulations. *J Phar Biol Anal* 2000; **23**:15–23.
13. LU J, LAU C, LEE MK et al. Simple and convenient chemiluminescence method for the determination of melatonin. *Anal Chim Acta* 2002; **455**:193–198.
14. MARTINEZ GR, RAVANAT JL, MEDEIROS MGH et al. Synthesis of a naphthalene endoperoxide as a source of ^{18}O -labeled singlet oxygen for mechanistic studies. *J Am Chem Soc* 2000; **122**:10212–10213.
15. DI MASCIO P, SIES H. Quantification of singlet oxygen generated by thermolysis of 3,3'-(1,4-naphthyldiene)dipropionate. Monomol and dimol photoemission and effects of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane. *J Am Chem Soc* 1989; **111**:2909–2914.
16. INOUE K, MATSUURA T, SAITO I. Mechanism of dye-sensitized photooxidation of triptophan and triptamine, and their derivatives. Singlet oxygen process in competition with type I process. *Bull Chem Soc Jpn* 1982; **55**:2959–2964.
17. FOOTE CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* 1991; **54**:659.
18. PIERLOT C, AUBRY J-M, BRIVIBA K et al. Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. *Methods Enzymol* 2000; **319**:3–20.
19. COHN M, URBY HC. Oxygen exchange reactions of organic compounds and water. *J Am Chem Soc* 1938; **60**:679–687.
20. BELL RP, McDUGALL AO. Hydration equilibria of some aldehydes and ketones. *Trans Faraday Soc* 1960; **56**:1281–1285.
21. BENDER ML, THOMAS RJ. The concurrent and alkaline hydrolysis and isotopic oxygen exchange of a series of *p*-substituted acetanilides. *J Am Chem Soc* 1961; **83**:4183–4189.
22. FANG X, JIN F, JIN H et al. Reaction of the superoxide radical with the N-centered radical derived from *N*-acetyltryptophan methyl ester. *J Chem Soc Perkin Trans* 1998; **2**:259–263.
23. MIYAMOTO S, MARTINEZ GR, MEDEIROS MGH et al. Singlet molecular oxygen generated from lipid hydroperoxides by the Russell mechanism: studies using ^{18}O -labeled linoleic acid hydroperoxide and monomol light emission measurements. *J Am Chem Soc* (in press).
24. MIYAMOTO S, MARTINEZ GR, MARTINS APB et al. Direct evidence of singlet molecular oxygen ($\text{O}_2(^1\Delta_g)$) production in the reaction of linoleic acid hydroperoxide with peroxynitrite. *J Am Chem Soc* 2003; **125**:4510–4517.
25. PACKER L, SIES H, eds. Singlet oxygen, UV-A, and ozone. *Methods Enzymol* 2000; **319**:682.
26. STONE TW. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Prog Neurobiol* 2001; **64**:185–218.
27. SILVA SO, XIMENES VF, CATALANI LH et al. Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **279**:657–662.
28. CILENTO G. Photobiochemistry in the dark. *Photochem Photobiol* 1980; **5**:199–228.
29. CILENTO G. Generation of electronically excited triplet species in biochemical system. *Pure Appl Chem* 1984; **56**:1179–1190.

Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil

Moacir Aloísio Torres ^a, Camila Pires Testa ^a, Catia Gáspari ^a, Mariana Beatriz Masutti ^a,
Clarice Maria Neves Panitz ^a, Rozangela Curi-Pedrosa ^b, Eduardo Alves de Almeida ^c,
Paolo Di Mascio ^c, Danilo Wilhelm Filho ^{a,*}

^a Departamento de Ecologia e Zoologia, Universidade Federal de Santa Catarina, c.p. 3159, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^c Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, c.p. 26.077, 05513-970 São Paulo, SP, Brazil

Abstract

Digestive glands of the mangrove mussel *Mytella guyanensis*, collected at one non-polluted site (site 1) and two polluted sites (sites 2 and 3), were analysed for different antioxidant defenses, lipid peroxidation and DNA damage. Thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine levels were enhanced at the polluted sites. With the exception of superoxide dismutase, the activities of catalase and glutathione peroxidase were also higher at the polluted sites. Greater increases were observed in glutathione reductase, glutathione S-transferase and etoxyresorufine-*O*-deethylase activities at the polluted sites. Conversely, reduced glutathione content was higher at the control site. Trace metal contents in mussels collected at polluted sites were increased compared to the control site, and there were strong positive correlations between TBARS and Cu and Pb contents. *M. guyanensis* is routinely exposed to an oxidative stress condition at both polluted sites, and considering xenobiotic bioaccumulation in bivalve molluscs, the mangrove mussel represents an excellent bioindicator for environmental monitoring studies. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Antioxidants; Oxidative stress; Metals; Bivalves; Bioindicators; Biomarkers

1. Introduction

The biological effects of reactive oxygen species (ROS) are generally similar in aerobic organisms and these ROS can oxidize biologically important molecules. Therefore, a continuous rate of ROS production, molecular oxidation and antioxidant consumption takes place even in healthy aerobic cells and tissues. An imbalance among these reactions can lead to a condition called oxidative stress (Halliwell and Gutteridge, 1999). Oxidative stress usually typifies the toxicity induced by xenobiotics (Lemaire and Livingstone, 1993; Di Giulio et al., 1995; Sheehan and Power, 1999), and bivalve mussels are good bioindicators for aquatic pollution associated with ROS generation and with changes in

their antioxidant defenses (ADs) (Adema et al., 1991; Livingstone et al., 1990; Lemaire and Livingstone, 1993; Rodríguez-Ariza et al., 1993a; Di Giulio et al., 1995; Sheehan and Power, 1999; Niyogi et al., 2001; Cheung et al., 2002; Vidal et al., 2002; Peña-Llopis et al., 2002).

Mussels have a bioaccumulation capability related to their filter-feeding condition, and other characteristics such as wide geographical distribution and abundance, sessile habit, and general physiological resistance, which have turned mussels ideal sentinels for the Mussel Watch programmes all over the world (Goldberg, 1975). There are many field and laboratory studies dealing with AD and detoxifying enzymes in the Northern Hemisphere especially in relation to the blue mussel *Mytilus edulis*, usually showing direct correlations between AD, detoxifying enzymes, damage to biomolecules and xenobiotics (e.g. Viarengo et al., 1990; Winston, 1991; Lemaire and Livingstone, 1993; Rodríguez-Ariza et al., 1993a; Livingstone, 1998), and also with seasonality (Walsh and O'Halloran, 1998; Sheehan and Power, 1999;

* Corresponding author. Address: Universidade Federal de Santa Catarina, Cidade Universitária, Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil. Tel.: +55-48-3316917; fax: +55-48-3315156.

E-mail address: dawifi@ccb.ufsc.br (D. Wilhelm Filho).

Niyogi et al., 2001; Vidal et al., 2002). On the other hand, only a few recent studies on mollusc species from the Southern Hemisphere are available in the relevant literature (Bainy et al., 2000; Wilhelm Filho et al., 2001b). Many mussel species can accumulate trace metals in concentrations directly proportional to that of the environment, and the main site of trace metal metabolism and accumulation is the digestive gland (Phillips and Rainbow, 1989; Coimbra and Carraca, 1990; Rainbow, 1990; Roesijadi and Robinson, 1994; Walsh and O'Halloran, 1997; Adler-Ivanbrook and Breslin, 1999). The present study was carried out in order to evaluate the trace metal contents and the effect of pollution on the AD system, the detoxifying enzymes and the DNA integrity of the digestive gland of the Brazilian mangrove mussel *Mytella guyanensis*, caught at two different polluted sites, in comparison with a control site.

2. Material and methods

2.1. Area description and mussel collection

The study area involved a non-polluted site (Ratones River = site 1) and a polluted mangrove called Itacorubi, located near the city of Florianópolis, Santa Catarina Island, southern Brazil (27°34'14"–27°35'31" S; 48°30'07"–48°31'33" W). The polluted site consists of two areas, Sertão River and Itacorubi River, named here sites 2 and 3, respectively. This mangrove system is drained by two relatively small rivers: the Sertão River (4 km in extent), which is contaminated mainly by domestic and chemical effluents from the campus of the Federal University of Santa Catarina, and the Itacorubi River (6 km in extent) heavily contaminated with domestic effluents, both showing a depth of 0.5–3.0 m and a mean width of 14 m. Despite the fact that this mangrove is defined as a preservation area, in recent decades it has suffered an increased anthropic influence including various kinds of disturbances. As a consequence, this area shows increased environmental problems such as diminished water quality, declining biodiversity and biomass production, and contamination with various pollutants that include trace metals (Da Silva et al., 1996). Adult individuals of *M. guyanensis* (total length range 5.1–7.5 cm), irrespective of sex, were collected at the three distinct sites during the high summer period (February), to avoid seasonal interferences (Phillips, 1977; La Touche and Mix, 1982; Sheehan and Power, 1999; Wilhelm Filho et al., 2001b), and 20 specimens were analysed from each site.

2.2. Trace metal analysis

A pool ($n = 15$) of mussels was analysed for each site. They were dried at 60 °C and then pulverized to a ho-

mogeneous particle size. Aliquots of 200 mg were submitted to a digestion process with 3 ml of 0.5 M HNO₃ at 120 °C for 5 h, and 1 ml of 0.1 M H₂O₂ solution at 60 °C for 1 h (Manly et al., 1996). After digestion, each sample was diluted in 100 ml of water (Millipore) and analyzed by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry (Varian Spectra640Z, with Zeeman background corrector).

2.3. Preparation of tissue extracts

The digestive glands were carefully excised, surface-dried with filter paper, weighed, thoroughly washed in ice-cold saline, and homogenized individually in 0.1% Triton X-100, 0.12 M NaCl, 30 mM NaPO₄, pH 7.4 (1:9, wet tissue weight: buffer volume) containing also freshly prepared protease inhibitors (0.3 mM PMSF and 0.05 mM trypsin inhibitor). The use of Triton X-100 implies in the measurement of total antioxidant enzymatic capacity of the organ. Homogenizations were carried out at 4 °C, using 15 strokes of a Potter–Elvehjem homogenizer, followed by centrifugation at 10 000 g for 5 min at 4 °C. The supernatants were used for enzymatic evaluations (see below for reduced glutathione measurements) and thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) contents. Aliquots of extracts were stored in liquid nitrogen (–170 °C) and examined separately for each assay.

2.4. Antioxidants, TBARS and EROD assays

Superoxide dismutase (SOD) activity was measured at 550 nm according to the method of cytochrome *c* reduction (Flohé and Ötting, 1984). Catalase (CAT) activity was determined by measuring the decrease in hydrogen peroxide (10 mM solution) concentration at 240 nm (Aebi, 1984). Glutathione peroxidase (GPx) was measured at 340 nm through the glutathione/NADPH/glutathione reductase (GR) system, by the dismutation of *tert*-butylhydroperoxide (Flohé and Gunzler, 1984). GR was measured at 340 nm through the oxidation rate of NADPH, in a reaction medium containing 0.1 M Na-PO₄ buffer, pH 7.0 containing 0.1% DPTA and 1 mM GSSG (Carlberg and Mannervik, 1985). The enzyme glutathione S-transferase (GST) was measured at 340 nm according to Habig et al. (1974), using CDNB as substrate. GSH was measured according to Beutler (1975), using Elmann's reagent (DTNB). Tissue acid extracts were obtained by the addition of 12% trichloroacetic acid (1:4 v/v), followed by centrifugation. Supernatants from the acid extracts were added to 0.25 mM DTNB in 0.1 M NaPO₄, pH 8.0, and the formation of thiolate anion was determined at 412 nm. Total glutathione (TG) was also measured at 412 nm according to the method of Tietze (1969), and oxidized glutathione (GSSG) was calculated in equivalents of

GSH. The EROD assay was used for the indirect evaluation of CYP1A1. Microsomes were prepared by the calcium aggregation method and differential centrifugation (Schenkman and Cinti, 1972), and protein content was determined according to Lowry et al. (1951). The EROD activity was estimated by direct fluorimetric detection of the 7-hydroxyresorufin metabolite, essentially as reported by Pohl and Fouts (1980). Determination of TBARS was used to assay endogenous lipid oxidation according to Ohkawa (1979) and Bird and Draper (1984). Fresh homogenates were added to 0.2 mM butylhydroxytoluene (BHT) to avoid further artifactual lipid oxidation. Tissue acid extracts were obtained by the addition of the homogenate to 12% trichloroacetic acid (1:4 v/v), followed by centrifugation. Supernatants were centrifuged at 5000g for 3 min, added to 0.67% (w/v) 2-thiobarbituric acid, maintained in boiling water for 60 min, cooled at 5 °C for 30 min, and then measured spectrophotometrically at 535 nm. Absorbances were expressed as nmol TBARS/g tissue ($\epsilon_{535} = 153 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Frozen samples were not used because even when reacted with BHT they showed artifactual lipid autoxidation, and, therefore, enhanced TBARS levels.

2.5. DNA extraction and hydrolysis and analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo)

DNA was isolated from the digestive glands using the chaotropic NaI method (Wang et al., 1994; Helbock et al., 1998) with some modifications. Briefly, 500 mg of tissue was homogenized in 5 ml of buffer A (320 mM sucrose, 5 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM desferroxamine and 1% Triton X-100, pH 7.5). After centrifugation at 1500 g for 10 min, the pellets were suspended in 5 ml of 10 mM tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 5 mM EDTA, 0.15 mM desferroxamine and 10% SDS. The RNase A (150 μl , 1 mg/ml) and RNase T1 (40 μl , 1000 U/ml) in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 1 mM EDTA and 2.5 mM desferroxamine were added to the assay and the reaction mixture was incubated at 50 °C. After 30 min, 150 μl proteinase K (20 mg/ml) was added to the assay followed by additional incubation at 37 °C for 1 h. After centrifugation at 5000g for 15 min, the liquid phase was collected and added to 3 ml of 7.6 M NaI, followed by the addition of 3 ml of isopropanol. The content in the tube was thoroughly mixed by inversion until a whitish precipitate appeared. The precipitate was collected by centrifugation at 5000g for 15 min and washed with 3 ml of 40% isopropanol (w/v), followed by 3 ml of 70% ethanol (w/v). After further centrifugation at 5000g for 15 min, the DNA pellet was solubilized in 300 μl of desferroxamine (0.1 mM). The DNA concentration was measured spectrophotometrically at 260 nm and its purity was assessed by $A_{260}/A_{280} > 1.75$. DNA (100 μg) was

diluted in 200 μl of deionized water, followed by the addition of 4 μl 1 M sodium acetate with 5 units of nuclease P_1 and incubation at 37 °C for 30 min. A total of 20 μl of 1 M tris-HCl (pH 7.4) and 2 units of calf intestinal alkaline phosphatase was then added, followed by incubation at 37 °C for 1 h, according to Fiala et al. (1999). 100% chloroform was added to the sample that was then centrifuged and the aqueous layer collected for analysis. The amount of 8-oxodGuo in the digestive glands of mussels was measured by high performance liquid chromatography coupled to electrochemical detection (HPLC/ECD) using a Shimadzu model LC-10AD/VP pump with a Phenomenex Spherex 5 C18 column (250 $\times$ 4.6 mm), a Shimadzu SPD-10AV/VP UV detector set at 254 nm and an electrochemical coulometric detector (ESA coulochem II 5021 Massachusetts, USA) with potentials set at 120 and 280 mV in electrodes 1 and 2, respectively. A Shimadzu Class-VP chromatography data system was used to calculate peak areas. The mobile phase consisted of potassium phosphate buffer (0.05 M, pH 5.5) containing 10% methanol and this was pumped at a flow rate of 1 ml/min (Helbock et al., 1998; Laws and Adams, 1996).

2.6. Chemicals and statistical analysis

All reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (Ohio, USA), with the exception of the standard working solutions for trace metal analysis which were prepared from Merk Titrisol solution (Germany). Statistical analysis was carried out using one-way ANOVA assuming homogeneity of variance, complemented by the Tukey-Kramer test, using a confidence interval of 5% ($p < 0.05$).

3. Results

The trace metal concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ wet weight) found in *Mytella*, together with the interval concentrations recommended by US government legislation, are

Table 1
Trace metal concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$, wet weight) in the digestive gland of *M. guyanensis* (this study) and maximum and minimum concentrations of these trace metals under the legislation of the government of the USA (Food and Drug Administration, FDA) in molluscs collected in clean waters from the North American coast

Source	Location	Cd	Cr	Pb	Cu
Sea Food	FDA	0.6–0.9	0.3–0.4	0.4–0.6	n.d.
<i>M. guyanensis</i>	Itacorubi River	0.91	0.43	0.90	11.31
<i>M. guyanensis</i>	Sertão River	0.41	0.42	0.67	12.47
<i>M. guyanensis</i>	Ratones River	0.63	0.56	0.41	7.29

n.d. means not determined.

Table 2

Trace metal concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$, dry weight) in the digestive gland of *M. guyanensis* and *M. edulis* from a pristine area (Laguna San Rafael, Chile; Manly et al., 1996), and maximum concentrations of these trace metals according to Spanish legislation

Source	Location	Cd	Cr	Pb	Cu
Spanish leg.		1.0	n.d.	5.0	20.0
<i>M. edulis</i>	San Raphael	1.4–3.1	0.6–2.6	n.d.	n.d.
<i>M. guyanensis</i>	Ratones River	3.9	3.4	2.6	45.2
<i>M. guyanensis</i>	Sertão River	2.9	3.0	4.8	88.7
<i>M. guyanensis</i>	Itacorubi River	7.6	3.6	7.5	94.4

n.d. means not determined.

shown in Table 1, while Table 2 shows the corresponding values of maximum concentrations allowed under Spanish legislation, and also the concentrations found in the blue mussel *M. edulis* (Manly et al., 1996) for comparison.

Mytella sampled at the polluted sites showed higher TBARS levels (site 2 = Sertão River, 186.5 ± 26.6 nmol TBARS g^{-1} , and site 3 = Itacorubi River, 299.4 ± 32.4 nmol TBARS g^{-1}) compared to animals caught at the control site (site 1 = Ratones River, 132.1 ± 38.6 nmol TBARS g^{-1}) (Fig. 1A). Accordingly, mussels from site 3 also showed higher levels of 8-oxodGuo (23.0 ± 1.6 residues of 8-oxodGuo/ 10^6 dGuo) than mussels collected at site 1 (14.8 ± 4.1 residues of 8-oxodGuo/ 10^6 dGuo) (Fig. 1B).

With the exception of SOD activities (318.0 ± 51.6 , 315.7 ± 45.4 , and 289.1 ± 49.3 U SOD g^{-1} , respectively, Fig. 1C), the other AD showed significantly increased levels at the polluted sites when compared to the control site (Figs. 1–4). GPx (1.07 ± 0.40 , 4.79 ± 0.74 , and 2.45 ± 0.37 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$, respectively) (Fig. 2A), GR (0.14 ± 0.03 , 1.47 ± 0.21 , and 2.83 ± 0.50 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$, respectively) (Fig. 2B), and CAT activities (3.12 ± 0.40 , 6.05 ± 0.19 , and 5.80 ± 0.40 mmol $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$) (Fig. 2C), were increased in animals from the polluted sites compared to the animals caught at the control site. Moreover, GST activities (Fig. 3A) in animals obtained at the two polluted sites (24.10 ± 1.50 and 16.78 ± 1.38 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) were higher than in those from the control site (10.39 ± 1.37 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$), as were the EROD activities (Fig. 3B) found in animals from site 2 (5.16 ± 0.23 pmol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) and site 3 (13.59 ± 0.17 pmol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) when compared to animals from the control site (1.34 ± 0.15 pmol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$).

On the other hand, the digestive gland concentrations of the GSH (Fig. 4A) in animals from site 2 (0.90 ± 0.17 mM) and site 3 (1.13 ± 0.08 mM) were significantly lower than in animals from site 1 (1.47 ± 0.06 mM). The

Fig. 1. (A) Lipid peroxidation levels (TBARS; nmol g^{-1}) in the digestive gland of *M. guyanensis* from the control site (site 1 = Ratones River) and from the polluted sites (site 2 = Sertão River, and site 3 = Itacorubi River). (B) Levels of 8-oxodGuo residues in the digestive glands (site 1 and site 3). (C) SOD activity (U SOD g^{-1}). (*) Indicates significant differences in relation to site 1 ($p < 0.05$).

GSSG contents (Fig. 4B) were increased approximately fivefold in mussels from the two polluted sites (1.40 ± 0.09 and 1.15 ± 0.1 mM, respectively) compared to controls (0.25 ± 0.04 mM). Accordingly, the concentrations of TG (Fig. 4C) were significantly increased in mussels from site 2 (2.31 ± 0.15 mM) and site 3 (2.27 ± 0.13 mM) in comparison to those from site 1 (1.72 ± 0.14 mM).

Fig. 2. (A) GPx ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) activity in the digestive gland of *M. guyanensis* from the control site (site 1 = Ratones River) and from the polluted sites (site 2 = Sertão River and site 3 = Itacorubi River). (B) GR activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$); (C) CAT activity ($\text{mmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$). (*) Indicates significant differences in relation to site 1 ($p < 0.05$).

4. Discussion

When compared to the control site, the mangrove drained by the Itacorubi and Sertão rivers is under a severe anthropic influence, showing high sediment concentrations of heavy metals, mainly Hg, Pb, Cr, and Cd (Harbison, 1986; Da Silva et al., 1996). The antioxidant status of the digestive gland of *Mytella* found in Itacorubi and Sertão rivers is in line with the incidence of heavy metal contamination found in the sediments (Da

Fig. 3. (A) GST activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) in the digestive gland of *M. guyanensis* from the control site (site 1 = Ratones River) and from the polluted sites (site 2 = Sertão River and site 3 = Itacorubi River). (B) EROD ($\text{pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) activity. (*) Indicates significant difference in relation to site 1 ($p < 0.05$).

Silva et al., 1996), and the evaluation of trace metal concentrations in the tissues of *Mytella* appears to confirm such a relationship. TBARS levels showed strong correlations with lead ($r = 0.98$) and cadmium ($r = 0.86$).

The trace metal concentrations of copper, cadmium and lead found in mussels from the Spanish coast were essentially the same as those found in tissues of *Mytella* in the present study, and the animals collected at the corresponding polluted sites displayed approximately two to four times the contents of those from the reference sites (Rodríguez-Ariza et al., 1993a, Table 1). Some reports have shown that the metal content of mussel species (e.g. Viarengo, 1989; Walsh and O'Halloran, 1998) is in excess of the maximum permitted levels according to the legislation of different countries. According to the FDA regulation (FDA, 1993) on molluscs harvested in clean waters from the North-American coast, only the samples from Ratones (control site) did not exceed allowable limits ($0.4\text{--}0.6 \mu\text{g g}^{-1}$, wet weight, Table 1). Considering lead contents on a dry weight basis, only the samples collected at site 3 showed a higher concentration than that allowed under Spanish legislation (Usero et al., 1996; FDA, 1993, Table 2), which has established maximum values for Pb concentrations of

Fig. 4. (A) GSH (mM); (B) GSSG (mM) and (C) TG levels (mM) in the digestive gland of *M. guyanensis* from the control site (site 1 = Ratones River) and from the polluted sites (site 2 = Sertão River and site 3 = Itacorubi River). (*) Indicates significant differences in relation to site 1 ($p < 0.05$).

$5 \mu\text{g g}^{-1}$ in bivalve molluscs intended for human consumption. Nevertheless, the concentrations found in *Mytella* sampled at site 2 were very near to this limit (Table 2). For both, wet and dry weight calculations, the copper concentrations found in animals from the two polluted sites were approximately twice as high as those in animals from the control site (Tables 1 and 2), and they all exceeded the limits permitted in bivalve molluscs for human consumption by the Spanish legislation

(Usero et al., 1996). The chromium concentrations (dry weight basis) found were similar at the three sites (Table 2), and were close to the values (range of $0.6\text{--}2.8 \mu\text{g g}^{-1}$) determined by Manly et al. (1996) for *M. edulis* sampled in a pristine area in southern Chile, but one order of magnitude lower than *M. edulis* exposed to a leather tannery effluent (Walsh and O'Halloran, 1998). Nevertheless, the concentrations calculated on a wet weight basis were above the limit established by the FDA (Table 1). The cadmium contents found in *Mytella*, measured on a dry weight basis, were above the FDA limits ($0.6\text{--}0.9 \mu\text{g g}^{-1}$, FDA, 1993). However, the cadmium contents of *M. edulis* ($1.4\text{--}3.1 \mu\text{g g}^{-1}$, Manly et al., 1996), sampled in a non-polluted area, were similar to those found at sites 1 and 2. On the other hand, on a wet weight basis, the contents in animals from the three sites were below the FDA values ($0.6\text{--}0.9 \mu\text{g g}^{-1}$, Table 1).

The high DNA and lipid oxidation found in *Mytella* collected at the polluted sites indicate that this organism is facing an oxidative challenge. This result agrees with a report in which *M. edulis* and *M. galloprovincialis* (Viarengo et al., 1990), when exposed to copper, showed elevated MDA levels after approximately one week. These findings contrast, in part, with those obtained in the field by Rodríguez-Ariza et al. (1993a) where the mussels *Chamaelea gallina* and *Crassostrea gigas*, showing higher tissue concentrations of trace metals, exhibited relatively lower levels of MDA. The authors explained these lower levels as a compensation for the enhanced levels of antioxidants found in mussel tissues in order to minimize the consequent oxidative stress. With the exception of SOD, all other antioxidant and biotransformation enzymes examined here also showed increased activities, but the levels of TBARS and 8-oxodGuo were still high in samples from both polluted sites.

With the exception of SOD activities, the other AD showed significantly higher levels at the polluted sites in comparison to the control site. Similar results were also obtained by Rodríguez-Ariza et al. (1993a), showing that mussels are able to increase their antioxidant levels in response to pollution. The maintenance of SOD activities in *Mytella* agrees with a recent study (Doyotte et al., 1997) in which no changes were detected in SOD activities in the mussel *Unio tumidus* exposed to copper. Conversely, CAT, GR and GPx activities of the digestive gland of *Mytella* were significantly increased at both polluted sites, while another mussel species *U. tumidus*, revealed no changes in CAT activity and decreased activity in relation to GR and GPx (Doyotte et al., 1997). GPx may be unsuitable as a biochemical marker of oxidative stress in mussels, a condition that seems also to be applied to fish liver, because increased activities (Rodríguez-Ariza et al., 1993b; Lenártova et al., 1997; Karakok et al., 1997), unchanged (Petrivalsky et al., 1997; Machala et al., 1997), or decreased (Bainy et al.,

1996) activities were already found in fish exposed to pollutants. On the other hand, the role of GR is to maintain high levels of constitutive GSH and, therefore, the marked induction of this enzyme at both polluted sites was not surprising, considering the significantly diminished GSH concentrations detected in animals from both polluted sites. The use of GR as an oxidative stress biomarker in fish was advocated by Vodcnik et al. (1981) almost two decades ago, taking into account the ubiquity and importance of GSH and the GSH cycle enzymes in the AD system of virtually all aerobic organisms. Increased activities of this enzyme were also found in fish exposed to a variety of pollutants (Rodríguez-Ariza et al., 1993b; Machala et al., 1997; Karakok et al., 1997; Petrivalsky et al., 1997), but unchanged levels have also been reported (Lenártova et al., 1997).

Decreased GSH levels found in mussels exposed to high copper concentrations in the sediments have also been described (Viarengo et al., 1988, 1990; Doyotte et al., 1997), but not in cadmium or zinc-exposed animals (Viarengo et al., 1990). Considering the permanent pollution input to both of the contaminated mangroves in this study (Da Silva et al., 1996), the lower GSH contents found in the digestive gland of *Mytella* may reflect the bioaccumulation of copper, and this is in agreement with the inverse relationship between this trace metal and the GSH concentrations. Furthermore, some trace metals can bind to GSH and thereby limit its availability to counteract lipoperoxidation and DNA oxidation (Di Giulio et al., 1995).

High levels of GSSG represent a biomarker of oxidative stress (Kosower and Kosower, 1978) and the high proportion of GSSG found in the digestive gland of *Mytella* is another indication that the organism is facing an acute oxidative stress condition at the two polluted sites. The levels of TG were high and similar to those previously found in fish liver (e.g. Rodríguez-Ariza et al., 1993b; Wilhelm Filho et al., 2001a), in mammals (Kosower and Kosower, 1978), and in *Perna perna*, another marine mussel species (Wilhelm Filho et al., 2001b). High contents of GSSG are relatively common in fish (Rodríguez-Ariza et al., 1993b) and molluscs (Wilhelm Filho et al., 2001b), but contrast with the very small amount of GSSG usually found in mammals (Kosower and Kosower, 1978), suggesting that thermoconformer organisms can tolerate high concentrations of GSSG when compared with thermoregulators such as birds and mammals (Wilhelm Filho et al., 2000). In situations of chronic exposure to polluted environments oxygen consumption increases and depletion in GSH is, therefore, expected (Wilhelm Filho et al., 2001a). It seems that oxidative stress can take place either due to increases in metabolic rate as a consequence of enhanced normal activities (Wilhelm Filho et al., 1993; Sheehan and Power, 1999; Wilhelm Filho

et al., 2001b), or due to acute or chronic exposure to pollutants (e.g. Di Giulio et al., 1995; Sheehan and Power, 1999; Wilhelm Filho et al., 2001a).

In respect of DNA damage, there are few reports in the literature concerning the effects of trace metals on the production of 8-oxodGuo in mussels. Mussels from site 3 showed increased levels of 8-oxodGuo, indicating a positive correlation between DNA damage and high levels of trace metals in the environment. It is accepted that metal ions, especially iron and copper, are involved in ROS production (Halliwell and Gutteridge, 1999). The inverse correlation of glutathione and TBARS concentrations (Viarengo et al., 1990; Doyotte et al., 1997; this study) as a consequence of metal-induced oxidative stress, in addition to the increased levels of 8-oxodGuo found at site 3, is probably derived from the Fenton's reaction, that is capable of generating hydroxyl radical, the most deleterious of the ROS (Winston, 1991; Halliwell and Gutteridge, 1999).

The higher induction of the cytochrome 1A isoform found in *Mytella* collected at the polluted sites was expected because this monooxygenase system is responsible for the biotransformation of organic pollutants, and is functionally linked to the enzymatic super-family of GSTs, which are able to conjugate and excrete xenobiotics in various animals (Williams, 1974; Commandeur et al., 1995). A similar trend has been identified in mussels (Livingstone et al., 1990; Lemaire and Livingstone, 1993; Sheehan and Power, 1999), carp (Machala et al., 1997), mullet (Rodríguez-Ariza et al., 1993b) and other fish species (Lemaire and Livingstone, 1993) exposed to a variety of pollutants in field and laboratory studies. Increased GST activity was also found in *C. gallina* exposed to trace metals, but not in two other mollusc species (Rodríguez-Ariza et al., 1993a), while Regoli and Principato (1995) found that *M. galloprovincialis*, when exposed to trace metals, did not increase tissue GST activities. Fitzpatrick et al. (1997) have suggested that GST should be used only as a specific biochemical marker of organic xenobiotics, in accordance with the findings of other field studies on mussels (Vidal et al., 2002; Cheung et al., 2002), but contrary to the suggestion of Rodríguez-Ariza et al. (1993b).

EROD activity indirectly reflects the sub-family CYP1A induction in vertebrates and invertebrates, which is strongly associated, among others, with activation of carcinogenic compounds such as polyaromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls (Lemaire and Livingstone, 1993; Gadagbui et al., 1996). Thus, the detection of EROD activity at all three sites, including the reference site, indicates that all the sites are probably contaminated with such compounds. However, the presence of high lead contents in sediments and tissues of *Mytella*, inhibiting heme synthesis that is essential for cytochrome structure and function, would interfere in the EROD measurement and, therefore, this parameter

was probably underestimated in the present study. Moreover, the digestive glands of some molluscs are not inducible (Livingstone, 1991; Rodríguez-Ariza et al., 1993a) or express the isoform CYP 1A only in the presence of high xenobiotic concentrations (Evans, 1987).

The augmented AD in marine organisms exposed to organic pollutants or trace metals is indicative of a necessity protection against ROS generation related to the presence of xenobiotics (Lemaire and Livingstone, 1993). The data obtained on the mangrove mussel indicate that non-enzymatic antioxidants such as glutathione, together with enzymatic antioxidants and biotransformation enzymes (CYP 1A and GST) in addition to damage to biomolecules such as lipid peroxidation and 8-oxodGuo, are useful biomarkers and indicate this species as an excellent bioindicator of mangrove pollution. Furthermore, analysis of parameters of oxidative stress promoted by pollution in *Mytella* is very promising with regard to in situ monitoring studies of mangrove ecosystems.

Acknowledgements

This work was partially supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil; proc. 301858/85-3) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São paulo (FAPESP). E.A.A. is a recipient of FAPESP fellowships.

References

- Adema, C.M., Van Der Knapp, W.P.W., Sminia, T., 1991. Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Reviews in Aquatic Sciences* 4 (2–3), 201–223.
- Adler-Ivanbrook, L., Breslin, V.T., 1999. Accumulation of copper, chromium, and arsenic in blue mussels (*Mytilus edulis*) from laboratory and field exposures to wood treated with chromated copper arsenate type c. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 (2), 213–221.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105, 121–126.
- Bainy, A.C.D., Almeida, E.A., Müller, I.C., Ventura, E.C., Medeiros, I.D., 2000. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Marine Environmental Research* 50, 411–416.
- Bainy, A.C.D., Saito, E., Carvalho, P.S.M., Junqueira, V.B.C., 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology* 34, 151–162.
- Beutler, E., 1975. In: *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. Grune and Stratton, New York, pp. 112–114.
- Bird, R.P., Draper, A.H., 1984. Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. *Methods in Enzymology* 90, 105–110.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase from rat liver. *Methods in Enzymology* 113, 484–490.
- Cheung, C.C.C., Zheng G.J., Lam, P.K.S., Richardson, B.J., 2002. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin* 45 (1–12), PII: S0025-326X(01)00301-0.
- Coimbra, J., Carraca, S., 1990. Accumulation of Fe, Zn, Cu, and Cd during the different stages of reproductive cycle of *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 95C, 265–270.
- Commandeur, J.N.M., Stijntjes, G.J., Vermeulen, N.P.E., 1995. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. *Pharmacological Reviews* 47 (2), 271–308.
- Da Silva, M.R., Lamotte, M., Donard, O.F.X., Soriano-Sierra, E.J., Robert, M., 1996. Metal contamination in surface sediments of mangroves, lagoons and Southern Bay in Florianópolis Island. *Environmental Technology* 17, 1035–1046.
- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: Rand, G.M. (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. Taylor and Francis, London, pp. 523–561.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babut, M., Vasseur, P., 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology* 39, 93–110.
- Evans, D.H., 1987. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives* 71, 47–58.
- Fiala, E.S., Conaway, C.C., Mathis, J.E., 1999. Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane. *Cancer Research* 49, 5518–5522.
- Fitzpatrick, P.J., O'Halloran, J., Sheehan, D., Walsh, A.R., 1997. Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.), as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers* 2, 51–56.
- Flohé, L., Gunzler, W.A., 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* 105, 114–121.
- Flohé, L., Ötting, F., 1984. Superoxide dismutase assays. *Methods in Enzymology* 105, 93–104.
- Food and Drug Administration, 1993. *Guidance Document for Cadmium in Shellfish*. Center for Food Safety and Applied Nutrition: US/FDA, Washington, 31pp.
- Gadagbui, B.K.-M., Addy, M., Goksoy, A., 1996. Species characteristics of hepatic biotransformation enzymes in two tropical freshwater teleosts, tilapia (*Oreochromis niloticus*) and mudfish (*Clarias anguillaris*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 114 (3), 201–211.
- Goldberg, E.D., 1975. The mussel watch: a first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 6, 111–132.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249, 7130–7139.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, London, 936pp.
- Harbison, P., 1986. Mangrove muds: a sink and a source for trace metals. *Marine Pollution Bulletin* 17 (6), 246–250.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B., Shigenaga, M.K., Walter, P.B., Woodal, A.A., Yeo, H.C., Ames, B.N., 1998. DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. In: *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of USA*, New York, vol. 95, pp. 288–293.
- Karakok, F.T., Hower, A., Phillips, D.H., Gaines, A.F., Yuregir, G., 1997. Biomarkers of marine pollution observed in species of mullet living in two eastern Mediterranean harbours. *Biomarkers* 2, 303–309.

- Kosower, N.S., Kosower, E.M., 1978. The glutathione status of cells. *International Review of Cytology* 54, 109–160.
- La Touche, Y.D., Mix, M.C., 1982. Seasonal variations of arsenic and other trace elements in bay mussels (*Mytilus edulis*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 29, 665–670.
- Laws, G.M., Adams, S.P., 1996. Measurement of 8-OHdG in DNA by HPLC/ECD: The importance of DNA purity. *BioTechniques* 20, 36–38.
- Lemaire, P., Livingstone, D.R., 1993. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. *Trends in Comparative Physiology* 1, 1119–1150.
- Lenártova, V., Holovska, K., Pedrajas, J.-R., Martínez-Lara, E., Peinado, J., López-Barea, J., Rosival, I., Kosuth, P., 1997. Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarkers of river pollution. *Biomarkers* 2, 247–252.
- Livingstone, D.R., 1991. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. *Advances in Comparative Environmental Physiology* 7, 45–185.
- Livingstone, D.R., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 120, 43–49.
- Livingstone, D.R., Martinez, P.G., Michel, X., Narbonne, J.F., O'hara, S., Ribera, D., Winston, G.W., 1990. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel *Mytilus edulis* L., and other molluscs. *Functional Ecology* 4, 415–424.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
- Machala, M., Petrivalski, M., Nezveda, K., Ulrich, R., Dusek, L., Piaka, V., Svodobová, Z., 1997. Responses of carp hepatopancreatic 7-ethoxyresorufin-O-deethylase and glutathione-dependent enzymes to organic pollutants: A field study. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (7), 1410–1419.
- Manly, R., Blundell, S.P., Field, F.W., McCabe, P.J., 1996. Trace metal concentrations in *Mytilus edulis* L. from the Laguna San Rafael, southern Chile. *Marine Pollution Bulletin* 32, 444–448.
- Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., Datta, A.G., 2001. Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. *The Science of the Total Environment* 281, 237–246.
- Ohkawa, H., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351–358.
- Peña-Llopis, S., Ferrando, M.D., Peña, J.B., 2002. Impaired glutathione redox status is associated with decreased survival in two organophosphate-poisoned marine bivalves. *Chemosphere*.
- Petrivalsky, M., Machala, M., Nezveda, K., Piaka, V., Svodobová, Z., Drábek, P., 1997. Glutathione-dependent detoxifying enzymes in rainbow trout liver: search for specific biochemical markers of chemical stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (7), 1417–1421.
- Phillips, D.J.H., 1977. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments: a review. *Environmental Pollution* 13, 281–317.
- Phillips, D.J.H., Rainbow, P.S., 1989. Strategies of metal sequestration in aquatic organisms. *Marine Environmental Research* 28, 207–210.
- Pohl, R.J., Fouts, J.R., 1980. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Analytical Biochemistry* 107, 150–155.
- Rainbow, P.S., 1990. Heavy metals in marine invertebrates. In: Furness, R.W., Rainbow, P.S. (Eds.), *Heavy metals in the Marine Environment*. CRC, Boca Raton, USA, pp. 67–79.
- Regoli, F., Principato, G., 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology* 31, 143–164.
- Rodríguez-Ariza, A., Martínez-Lara, E., Pascual, P., Pedrajas, J.R., Abril, N., Dorado, G., Toribio, F., Bárcena, J.A., Peinado, J., Pueyo, C., López-Barea, J., 1993a. Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *The Science of the Total Environment (Suppl.)*, 109–116.
- Rodríguez-Ariza, A., Peinado, J., Pueyo, C., López-Barea, J., 1993b. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50, 2568–2573.
- Roesijadi, G., Robinson, W.E., 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation, and release. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology—Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*. Lewis, Boca Raton, USA, pp. 387–420.
- Schenkman, J.B., Cinti, D.L., 1972. Preparation of microsome with calcium. *Methods in Enzymology* 52, 83–89.
- Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve mollusc. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 123, 193–199.
- Tietze, F., 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* 27, 502–522.
- Usero, J., Regalado, E.G., Gracia, I., 1996. Trace metals in the bivalve mollusc *Chamaelea galina* from the Atlantic Coast of Southern Spain. *Marine Pollution Bulletin* 32, 305–310.
- Viarengo, A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. In: *CRC Reviews in Aquatic Sciences*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 295–317.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M.N., Orunesu, M., 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comparative Biochemistry and Physiology* 97C, 37–42.
- Viarengo, A., Pertica, M., Canesi, L., Biasi, F., Cecchini, G., 1988. Effects of metals on lipid peroxidation in mussel tissues. *Marine Environmental Research* 24, 354–361.
- Vidal, M.-L., Bassères, A., Narbonne, J.-F., 2002. Seasonal variations of pollution biomarkers in two populations of *Corbicula fluminea* (Müller). *Comparative Biochemistry and Physiology C* 131, 133–151.
- Vodicnik, M.J., Elcombe, C.R., Lsch, J.J., 1981. The effect of various types of inducing agents on hepatic microsomal monooxygenase activity in rainbow trout. *Toxicology Applied and Pharmacology* 59, 364–374.
- Walsh, A.R., O'Halloran, J., 1997. The accumulation of chromium by the mussel *Mytilus edulis* (L.) as a function of valency, solubility and ligation. *Marine Environmental Research* 43, 41–54.
- Walsh, A.R., O'Halloran, J., 1998. Accumulation of chromium by a population of mussels (*Mytilus edulis*) exposed to leather tannery effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 1429–1438.
- Wang, L., Hirayasu, K., Ishizawa, M., Kobayashi, Y., 1994. Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nucleic Acids Research* 22, 1774–1775.
- Wilhelm Filho, D., Giuvili, C., Boveris, A., 1993. Antioxidant defenses in marine fish. I. Teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology* 106C, 409–413.
- Wilhelm Filho, D., Marcon, J.L., Fraga, C.G., Boveris, A., 2000. Antioxidant defenses in vertebrates: emphasis on fish and mammals. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology* 7, 33–45.

- Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Tribess, T.A., Pedrosa, R.C., Soares, C.H.L., 2001a. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses in the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). Brazilian Journal of Medical and Biological Research 34 (5), 719–726.
- Wilhelm Filho, D., Tribess, T.A., Gáspari, C., Claudio, F.D., Torres, M.A., Magalhães, A.R.M., 2001b. Seasonal changes in antioxidant defenses in the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). Aquaculture 203, 149–158.
- Williams, R.T., 1974. Inter-species variations in the metabolism of xenobiotics. Biochemical Society Transactions 2, 359–377.
- Winston, G.W., 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. Comparative Biochemistry and Physiology C 100, 173–176.

Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil

A.C.D. Bainy*, E.A. Almeida, I.C. Müller,
E.C. Ventura, I.D. Medeiros

*Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática, Departamento de Bioquímica,
CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil*

Received 29 April 1999; received in revised form 9 December 1999; accepted 20 January 2000

Abstract

The effects of contaminants on the biochemical parameters of the intensively farmed mussel *Perna perna*, are unknown. The aim of this study was to compare biochemical responses in mussels held in clean and contaminated sites in Santa Catarina Island, Brazil. Mussels were transplanted from a farming area, Ratones Grande Island (RGI), to two contaminated sites, Itacorubi (ITAC) and Hercílio Luz Bridge (HLB). A reference group was kept at RGI. After 150 and 180 days of exposure, the digestive glands of the mussels were analyzed for catalase, glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and glutathione *S*-transferase (GST) activities. No changes were observed in the catalase activity, in both periods. Low G6PDH activity was observed in mussels transplanted for 150 days at the ITAC site. Increased GST activity was observed in mussels from ITAC and HLG sites after 180 days. These responses are probably related to the augmented discharges of domestic effluents associated with elevated rainfall index. © 2000 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Antioxidant enzymes; Aquaculture; Biomarker; Effects — biochemical; Enzymes; Florianópolis; Monitoring; Mussel; *Perna perna*; Transplant

1. Introduction

Mussel farming in Santa Catarina state (SC) in southern Brazil has increased significantly in the last 5 years with more than 7500 t of the marine mussel *Perna perna*

* Corresponding author. Tel.: + 55-48-3319-589; fax: + 55-48-3319-672.

E-mail address: bainy@mbox1.ufsc.br (A.C.D. Bainy).

produced in 1997 (Costa, Grumman, Neto & Rockanski, 1998). Effluent discharges in coastal zones may affect the health and marketability of farmed mussels; however, information on the levels of contaminants in the farming areas and related biological responses in the mussel *P. perna* is lacking. In this study, we evaluated the use of biomarkers for determining the effect of contaminant exposure on mussels.

Catalase is an antioxidant which decomposes hydrogen peroxide generated within cells. Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) is the key regulatory enzyme of the pentose-phosphate shunt and is necessary for the regeneration of reducing power nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (NADPH). The role of glutathione *S*-transferase (GST), a Phase II enzyme, is to conjugate tripeptide glutathione with electrophilic and other xenobiotics.

The suitability of antioxidant and Phase II enzyme activities as biomarkers of pollutants in mussels is uncertain (Fitzpatrick, O'halloran, Sheehan & Walsh, 1997; Regoli, Hummel, Amiard-Triquet, Larroux & Sukhotin, 1998). The goal of this study was to investigate the activities of catalase, G6PDH and GST in digestive glands of *P. perna* transplanted from farming areas to contaminated sites.

Sixty mussels (4–5 cm length) were collected from Ratones Grande Island (RGI), the reference site, in November 1997 (spring). Two samples of 20 mussels were transplanted and held for 150 and 180 days, respectively, at the contaminated sites, Itacorubi (ITAC) and Hercílio Luz Bridge (HLB; Fig. 1). A reference group of 20 mussels was kept at RGI. Water temperature, salinity and pH was recorded monthly at the three sites and the rainfall index was obtained at the Centro Integrado de Meteorologia e Recursos Hídricos de Santa Catarina (Climerh-Epagri). After 150 and 180 days of exposure the digestive glands of five to 10 mussels collected, respectively, from each site were excised and processed as described by Livingstone (1988). The activities of catalase (Beutler, 1975), G6PDH (Glock & McLean, 1953) and GST (Keen, Habig & Jakoby, 1976) were measured in the cytosolic fraction (supernatant) of the digestive gland obtained after a differential centrifugation at 10,000 *g* for 20 min and centrifugation of the supernatant at 38,000 *g* for 70 min. The data were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) test followed by Duncan's test for multiple comparisons with unequal numbers of samples for 150 and 180 days of exposure at the three sites: $P < 0.05$ was accepted as significant. Results are presented as mean $\pm$ S.D.

Water temperature at the three sites decreased from 30 to 21°C concurrently during the experimental period. The pH and salinity remained nearly constant at 8.23 ± 0.07 and $32.3 \pm 1.2\%$, respectively.

The activity of catalase, G6PDH and GST in the digestive gland of the mussels collected at the three sites at 150 and 180 days is shown in Fig. 2. No significant changes were observed in catalase activity of digestive gland in mussels at any site at 150 or 180 days of exposure (Fig. 2). However, a slight increase in the catalase activity in all groups was observed at 180 days of exposure (autumn). This result may be due to seasonal variations in catalase activity probably related to changes in metabolic pattern, food availability and/or reproductive status, since *P. perna* has a reproductive peak on the Brazilian coast in autumn (Ferreira & Magalhães, 1997).

Fig. 1. Map of Brazil showing Santa Catarina State and the positions of the reference and transplanting sites on Santa Catarina Island. RGI, Ratones Grande Island (Reference); ITAC, Itacorubi; HLB, Hercilio Luz Bridge.

A significantly lower G6PDH activity was observed in mussels kept for 150 days at ITAC (Fig. 2). A similar, but not significant trend, was observed in mussels kept for 180 days at this site. Low G6PDH activity may compromise cellular NADPH production, required for maintaining the antioxidant power, biotransformational reactions and lipid biosynthesis pathway. Bainy, Saito, Carvalho and Junqueira (1996) observed reduced G6PDH activity in gill, liver and kidney of tilapia from a

Fig. 2. Analysis of catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and glutathione *S*-transferase (GST) in digestive gland of *Perna perna* kept at Ratones Grande Island (RGI), Itacorubi (ITAC) and Hercilio Luz Bridge (HLB) sites for 150 and 180 days. Number of samples are indicated in parentheses. Same letters indicate significant differences for $P < 0.05$, by one-way analysis of variance (ANOVA) test, followed by Duncan's test for multiple comparisons.

contaminated site which was associated with the oxidative stress in these tissues. Kohler, Bahns and Van Noorden (1998) recently observed that prolonged pollutant exposure partially inhibits or inactivates G6PDH in flounder liver tissue which is compensated by a reduction in K_m . The kinetic properties of G6PDH in the digestive gland of *P. perna* are unknown and the differences in G6PDH activity between mussels from the two contaminated sites in this study are not clearly understood.

The mussels held for 150 days at the three sites showed no significant differences in GST activity (Fig. 2). However, mussels held for 180 days at HLB and ITAC sites showed significant increase of 4.4- and 1.4-fold, respectively. The high GST activity at HLB and ITAC sites could be associated with the elevated rainfall index observed in the period preceding mussel collection at 180 days. According to Climerh-Epagri (1998) the accumulated rainfall index recorded 8 days before the mussel collection at 180 days was 3.4-fold higher than that observed at the same period preceding the collection at 150 days (137.7 and 39.9 mm, respectively). Rain runs untreated from Santa Catarina Island directly into the ocean, causing greater xenobiotic input which could induce biological responses in the exposed organisms, such as the observed increase in GST activity.

Studies on the inducibility of GST activity in mussels from contaminated sites have yielded inconsistent results. Fitzpatrick et al. (1997) observed high GST activity in mussels from industrial sites but no changes were observed in mussels held near to leather tannery effluents. To the contrary, GST inhibition was observed by Regoli et al. (1998) on studies with antarctic scallop *Adamussium colbecki* contaminated with Cu and Hg. Our studies further support GST as useful biomarker of aquatic contamination. However, data analysis must be done with caution, since different chemicals can promote distinct effects on the GST activity. Additional studies to determine agonistic or antagonistic effects of chemicals isolated or administrated together on the GST activity of digestive gland of *P. perna* are needed to validate the use of this parameter as a biomarker of aquatic contamination in the natural environment.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Jaime F. Ferreira and Dr. Aimê R.M. Magalhães (Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos and Laboratório de Mexilhões) for providing the reference mussels used in this study. This work was supported in part by CNPq (No. 522765/95-5) and DAP-Funpesquisa 96/UFSC. A.C.D.B. is a recipient of productivity fellowship (CNPq No. 522765/95-5).

References

- Bainy, A. C. D., Saito, E., Carvalho, P. S. M., & Junqueira, V. B. C. (1996). *Aquatic Toxicology*, 34, 151–162.
- Beutler, E. (1975). *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton.
- Costa, S. W., Grumman, A., Neto, F. M. O., & Rockanski, M. (1998). *Productive chains of Santa Catarina State: aquaculture and fisheries* (Technical Report No. 97). Florianópolis: Epagri (in Portuguese).

- Ferreira, J. F. & Magalhães, A. R. M. (1997). *Mussels, biology and farming*. Florianópolis: UFSC, (in Portuguese).
- Fitzpatrick, P. J., O'halloran, J., Sheehan, D., & Walsh, A. R. (1997). *Biomarkers*, 2, 51–56.
- Glock, G. E., & McLean, P. (1953). *Biochemical Journal*, 55, 400–408.
- Keen, J. H., Habig, W. H., & Jakoby, W. B. (1976). *Journal of Biological Chemistry*, 251, 6183–6188.
- Kohler, A., Bahns, S., & Van Noorden, C. J. F. (1998). *Marine Environmental Research*, 46, 179–183.
- Livingstone, D. R. (1988). *Marine Ecology Progress Series*, 64, 37–43.
- Regoli, F., Hummel, H., Amiard-Triquet, C., Larroux, C., & Sukhotin, A. (1998). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35, 594–601.

Effects of trace metal and exposure to air on serotonin and dopamine levels in tissues of the mussel *Perna perna*

Eduardo A. Almeida ^a, Afonso C.D. Bainy ^b, Marisa H.G. Medeiros ^a,
Paolo Di Mascio ^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26.077, 05513-970 São Paulo, SP, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

Abstract

We evaluated levels of serotonin (5HT) and dopamine (DOPA) in muscle and digestive glands of the mussel, *Perna perna*, collected at different times of day; exposed to air for 24 h, followed by re-submersion; and after exposure to different metals. Mussels collected at different periods of day showed little oscillation in 5HT and DOPA levels. Mussels exposed to metals showed significant changes in 5HT and DOPA levels in digestive gland and muscle, as did mussels exposed to air. Our data suggest that analyses of 5HT and DOPA in tissues of mussels could serve as a tool to evaluate the presence and effects of heavy metal contamination in mussels. Care in data interpretation is required, however, since other environmental factors such as exposure of mussels to air (i.e. at low tides) can also cause changes in DOPA and 5HT levels. Additional research is necessary to separate such natural environmental effects from effects of contaminants.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Mussel; Heavy metal; Air exposure; Serotonin; Dopamine; *Perna perna*

1. Introduction

Mussels have been proposed as sentinel organisms in monitoring programs; they are sessile filter-feeders and possess considerable tolerance to adverse environmental conditions such as tidal, salinity and temperature oscillations (Canova et al., 1998; Goldberg and Bertine, 2000).

Dopamine (DOPA) and serotonin (5-hydroxy-tryptamine, 5HT) are known to play different functions in marine bivalves. Serotonin causes relaxation and opening of the mussel siphon (Ram et al., 1999) and relaxation of the adductor muscle (Gies, 1986), and the byssus retractor muscles (Muneoka et al., 1991), as well as important regulatory roles in mussel reproductive cycles (Pani and Croll, 1998).

Controversial data are available concerning the role of DOPA at the neuromuscular junction. It has been shown that DOPA produces relaxation of contracted

smooth muscle fibers in *Mytilus edulis* (Gies, 1986), but a contractor effect was also observed in the adductor muscles of the freshwater mussel *Anodonta cygnea* (Salánki, 1971; Nemcsök et al., 1997). DOPA is also thought to play an important role in protein sclerotization of the shell, producing a thin organic layer, the periostracum (Almeida et al., 1998).

Bivalves have the ability to accumulate trace metals in soft tissues and shells and serve as good integrators of metal contamination in the marine environment (Goldberg and Bertine, 2000). Trace metals are known to cause physiological changes in marine organisms, such as respiration (Brown and Newell, 1972), membrane structure and permeability (Viarengo, 1989) and protein configuration (Viarengo et al., 1982; Rao et al., 1993). Metals also are known to bind DOPA receptors in the synaptic cleft, causing serious damage to the nervous system leading to alterations in the activity of tryptophan hydroxylase, the rate-limiting enzyme in 5HT biosynthesis (Khan and Thomas, 2000; Gedeon et al., 2001).

Analyses of 5HT and DOPA levels in marine organisms can be used as a tool for the assessment of

* Corresponding author. Tel.: +55-11-3091-3815x224; fax: +55-11-3815-5579.

E-mail address: pdmascio@iq.usp.br (P. Di Mascio).

environmental contamination (Nemcsök et al., 1997; Rademacher et al., 2001), but several environmental factors such as rainfall, temperature variations, pH, and oxygen availability as well as tidal oscillation, may affect DOPA and 5HT metabolism.

It has been shown that valve closure is the first response of mussels to several stresses, avoiding contact with any adverse environmental change (Akberali and Trueman, 1982). This mechanism is expected to cause oscillations in DOPA and 5HT levels, since these two compounds are involved in the relaxation of muscle fibers. However, such responses are not well known in the brown mussel *Perna perna*.

Since metals and environmental factors can cause changes in 5HT and DOPA levels, we evaluated levels of 5HT and DOPA in adductor muscle and digestive gland of *P. perna* (1) collected at different times of day, (2) exposed to sub-lethal concentrations of metals, and (3) exposed to air for 24 h followed by re-submersion in seawater for 3 h, to verify a possible use of 5HT and DOPA analyses as tools for the investigation of the marine environment quality.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Serotonin (5-hydroxytryptamine), L-dopamine, lead acetate, cadmium acetate, copper sulfate, and potassium phosphate were purchased from Sigma-Aldrich CO (St. Louis, MO), iron sulfate heptahydrate, formic acid from Merck KgaA, Darmstadt, Germany and acetonitrile from Em Science (Gibbstown, NJ).

2.2. Mussels

Mussels, *P. perna*, of similar length (8–12 cm), were purchased from an aquaculture facility at Sambaqui beach (Florianópolis, SC, Brazil). The trace metal exposure experiment was done in summer, 2001. Experiments that dealt with different periods of the day and air exposure were carried out in early autumn, 2002.

2.3. Collect of mussels at different time of day

We placed 24 mussels in an aerated tank containing 24 l of seawater for analyses of DOPA and 5HT at different periods of day. After one day of acclimatization, groups of six mussels were collected, respectively, at the following times: 10:00 AM, 4:00 PM, 10:00 PM, and 4:00 AM. The muscle tissues (including adductor, byssus and foot retractor muscles) and digestive gland were dissected and immediately immersed in liquid nitrogen. Experimental water temperature was between 17 and 18 °C.

2.4. Heavy metal exposure experiment

Mussels were sorted to five groups of 16 specimens each, and placed into five tanks, containing 0.5 l of seawater per mussel. After one day of acclimatization, four groups were exposed to sublethal doses of lead acetate (200 mg/l), iron sulfate (500 µg/l), cadmium acetate (200 µg/l) and copper sulfate (40 µg/l). These concentrations were chosen based on sublethal LC₅₀ concentrations reported for mussels (Prakash and Rao, 1995; Viarengo et al., 1997; Viarengo et al., 1999). One group was held at similar water conditions but without metals, the control group. Water from control and treated groups were renewed daily. After 12, 24, 72 and 120 h of exposure, four mussels from each group were sacrificed and their tissues dissected. Water temperatures varied from 19 to 21 °C.

2.5. Air exposure experiment

We divided mussels into three groups of six individuals; one was kept constantly immersed in aerated seawater for 24 h, and two groups were kept out of the seawater tank for 24 h. After 24 h, one of the air exposed group and the submersed group were sacrificed and their tissues collected. The remaining air exposed group was re-submerged in aerated seawater for three additional hours, when their tissues were collected. Water temperature was 18 °C.

2.6. Sample preparation and simultaneous detection of 5HT and DOPA

The levels of 5HT and DOPA in samples were analyzed by a high performance liquid chromatography system composed by two pumps (LC-10AD, Shimadzu, Kyoto, Japan), a communicator bus module (CBM-10A, Shimadzu) and a Decade amperometric electrochemical detector (Antec, The Netherlands). Muscle tissues and digestive gland were homogenated (1:5 volumes) in the mobile phase (95% potassium phosphate dihydrogen 25 mM, 0.1% formic acid, pH 2.9 and 5% acetonitrile), and centrifuged (5000g) for 15 min, at 4 °C. The supernatant fraction was filtered and injected (20 µl) directly to the HPLC column (Supelcosil LC18, 150×4.6 mm, 5 µm particle size, Supelco). The mobile phase was isocratically pumped at a flow rate of 1 ml/min.

Voltamograms of 5HT and DOPA were constructed to verify the best signals of these compounds, through injections of 5 pmol of 5HT and DOPA authentic standards. Levels of DOPA and 5HT in the samples were calculated based on standard calibration curves, which were constructed by injections of 1–20 pmol according to concentrations of 5HT and DOPA in the samples.

2.7. Statistical analysis

Statistical analyses used Microcal Origin 6.0 software (Northampton, MA, USA). Results are presented as means $\pm$ standard deviation. Significant differences between different groups were studied using a *t*-test and one-way analysis of variance, and $p < 0.05$ was accepted as significant.

3. Results and discussion

3.1. Validation of the method for simultaneous 5HT and DOPA detection in samples

Fig. 1 shows the voltamograms of injections of 5 pmol of 5HT and 5 pmol of DOPA, respectively, into the HPLC system, at different electrochemical potentials. The best signal was obtained at 0.7 V for both 5HT and DOPA. This potential was used to prepare the standard curve and to analyze the samples. Fig. 2 shows the chromatogram profile of a 20 μ l injection, indicating the peaks for 5HT and DOPA. The peaks were identified based on retention time and by spiking samples with authentic standards. The detection limit of the two compounds was 0.7 pmol (1:3 noise/signal ratio). The calibration curves (Fig. 3) were carried out by injections of 1 to 20 pmol according to the concentrations of 5HT and DOPA in the samples.

Fig. 1. Voltamogram obtained after the injection of 5 pmol of serotonin (A) and 5 pmol of dopamine (B) into the HPLC system, varying the electrochemical potential from 0.5 to 0.9 V.

Fig. 2. Chromatogram obtained after the injection of 20 μ l of a sample, indicating the peaks corresponding to serotonin (5HT) and dopamine (DOPA).

Fig. 3. Standard calibration curves used for dopamine and serotonin quantification in samples.

3.2. Analysis of 5HT and DOPA in the samples

It is known that 5HT and DOPA play important roles in the control of biological rhythms of marine bivalves, and that metals induce change in mussel physiology; thus, metals could be able to promote changes in biological rhythms by its interference with 5HT and/or DOPA metabolism (Salánki and Hiripi, 1990). However, the profile of such metabolism in response to metals has not been well characterized, to distinguish it from typical responses to environmental changes. We therefore were interested in verifying if there are typical 5HT and DOPA responses for metal

Fig. 4. Levels of serotonin (5HT, A and B) and dopamine (DOPA, C and D) in digestive gland (DG, A and C) and muscle tissues (B and D) of mussels collected at 10:00 A.M., 4:00 P.M., 10:00 P.M., and 4:00 A.M. Same letters indicates similar values. Different letters indicates statistical differences ($p < 0.05$), $N = 6$.

exposure, different from those caused by environmental factors such as different time of day and air exposure/re-submersion, thus opening new perspectives for the use of 5HT and DOPA in monitoring programs.

Both 5HT and DOPA basal levels were some 10 to 20-fold greater in muscles than in digestive glands (Fig. 4 B, D and A, C respectively), indicating the role of these compounds in muscle. No differences were observed in 5HT levels at four different periods of the day in muscles nor in DOPA levels of the digestive gland. However, the level of 5HT in the digestive gland was higher at 4:00 A.M., and the level of DOPA was lower in muscles at 4:00 P.M. Recently, it has been demonstrated that DOPA and 5HT are necessary for the feeding response in molluscan model systems (Kemenes, 1997), suggesting that 5HT variation in digestive glands could be associated to feeding activity.

Fig. 5 shows levels of 5HT and DOPA in muscle of control and treated mussels at different periods of exposure to trace metals. Levels of 5HT were significantly lower in muscles after 24 and 72 h exposure to lead and cadmium relative to the control group. Greater levels of 5HT observed in muscle tissue of controls could be associated with a physiological relaxation of its adductor muscle, providing for opened valves, and thus facilitating ventilation and feeding. The depletion of 5HT levels in the mussels exposed to lead, cadmium and iron could be related to more prolonged periods of adductor muscle contraction and shell closure in response to the stress. Similarly, the levels of 5HT were lower in digestive glands of mussels exposed to lead and iron for 72 and 120 h, and exposed to cadmium and copper for 72 h (Fig. 6).

Mussels exposed to iron for 12 h showed greater levels of 5HT than found in muscle of control mussels, evidencing an opposite effect of this metal on 5HT levels

Fig. 5. Levels of serotonin (5HT) and dopamine (DOPA) in muscle tissues of control mussels (continuous lines) and mussels exposed (dotted lines) to lead (Pb), copper (Cu), cadmium (Cd) and iron (Fe), along 12, 24, 72 and 120 h of exposure. * indicates statistical differences in relation to the control group ($p < 0.05$), $N = 4$.

in short-term exposure. Nevertheless, after 24 h of exposure to iron the levels were lower than control value, and after 72 and 120 h the levels of 5HT were not affected. Also, mussels exposed to copper and iron for 24 h had increased levels of 5HT in digestive glands. All these findings are consistent with the fact that trace metals can promote changes in 5HT levels.

Accordingly, Khan and Thomas (2000) showed a strong inhibitory effect of lead on the enzyme tryptophan hydroxylase, associated with lower levels of 5HT in the Atlantic croaker. In addition, Lafuente et al. (2001) observed significant changes in the 5HT levels in rats exposed to cadmium. Andersson et al. (1997) reported decreased 5HT levels after exposure of lactating rats to cadmium and Franchini et al. (1999) observed lower levels of 5HT after exposure of fish (*Carassius carassius*) to lead for 48 and 96 h.

Recently, Gedeon et al. (2001) observed increased levels (230%) of DOPA in nervous system of rats after 60 days of exposure to lead, and decreased DOPA levels

Fig. 6. Levels of serotonin (5HT) and dopamine (DOPA) in digestive glands (DG) of control mussels (continuous lines), and mussels exposed (dotted lines) to lead (Pb), copper (Cu), cadmium (Cd) and iron (Fe), along 12, 24, 72 and 120 h of exposure. * indicates statistical differences in relation to the control group ($p < 0.05$), $N = 5$.

during 120 days of exposure to this metal, which was related to the binding of lead to the DOPA receptors, causing its depletion. Rademacher et al. (2001) observed a markedly DOPA depletion in nervous system of trout (*Onchorhynchus mykiss*) after two weeks of lead exposure.

Effects in muscles of mussels exposed to lead is shown in Fig. 5. After 12 h of lead, copper, cadmium, and iron exposure, mussels had higher levels of DOPA in muscle relative to control group. Increased levels of DOPA strongly decreased after 24, 72 and 120 h of lead exposure in muscle and after 120 h in digestive gland. Lower levels of DOPA were also observed in muscles after 120 h of exposure to copper and after 24 h of iron exposure. These data suggest a time-response of DOPA in muscles of mussels exposed to lead, despite a report on exposure

Fig. 7. Levels of serotonin (5HT, A and B) and dopamine (DOPA, C and D) in digestive glands (DG, A and C) and muscles (B and D) of mussels constantly submersed in seawater (Control), exposed to air for 24 h (air) and exposed to air for 24 h followed by re-submersion in seawater for 3 h (Re-sub). Same letters indicates similar values. Different letters indicates statistical differences ($p < 0.05$), $N = 6$.

of mice to copper which also causes depletion in the level of DOPA (Alcaraz-Zulbedia et al., 2001).

Increased levels of DOPA were also observed after 12 h of exposure of digestive gland tissue to cadmium and iron.

In respect to air exposure, we observed that mussels exposed to air for 24 h had significant decrease in levels of 5HT and DOPA in muscles, and no changes in digestive gland (Fig. 7). Differences observed in muscle tissues are probably related to the “catch contraction” of muscle fibers for the valve closure, avoiding desiccation. As 5HT and DOPA cause relaxation of muscles, it is expected that these two compounds are decreased in contracted muscles, as observed. During the re-submersion period, mussels relax muscular contraction opening their valves to return to ventilation. As observed in Fig. 7, after 3 h of re-submersion, levels of 5HT increased, corroborating such hypothesis. Nevertheless, DOPA levels remained low.

4. Conclusions

Both metal exposure and environmental factors can be responsible for changes in 5HT and DOPA levels in different tissues of mussels, but no typical, or specific response was identified for each experiment, suggesting that while metals can promote 5HT and DOPA change in mussels, this could be masked by other environmental factors such as time of day or different tidal conditions.

Moreover, data presented in this work substantiates that elevated levels of DOPA and 5HT in muscle tissues as contrasted with in digestive gland tissue of *P. perna* corroborate their roles in relaxation of muscle fibers. Exposure of mussels to air and metals can cause alterations in the levels of DOPA and 5HT, mainly in muscle tissues. These results suggest that the main variations in

DOPA and 5HT observed in muscles were related to the opening and closure of the mussel valves in response to the stress. When the mussels are exposed to heavy metal it is possible that the binding of metals to DOPA receptors and the inhibition of the tryptophan hydroxylase activity could also contribute to reduced levels of 5HT and DOPA. Similar results were also observed by Salánki and Hiripi (1990), who observed decreased levels of DOPA and 5HT in nervous systems of freshwater mussels (*A. cygnea*) exposed to heavy metals.

Finally, our data demonstrate that analyses of 5HT and DOPA in tissues of mussels could serve as a tool to investigate the effects of heavy metal contamination in marine environments, although other environmental factors could be responsible for change in DOPA and 5HT levels in muscles of mussels. Such factors limit the usefulness of this system at this time and further research will be necessary to refine this technique before it becomes a practical monitoring tool.

Acknowledgements

This work was supported by the “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo”, FAPESP (Brazil), the “Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico”, CNPq (Brazil), the “Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência”, PRONEX/FINEP (Brazil), and Pró-Reitoria de pesquisa da Universidade de São Paulo. E.A.A. is a recipient of the FAPESP fellowships.

References

- Akberali, H.B., Trueman, E.R., 1982. Effects of environmental stress on marine bivalve molluscs. *Adv. Mar. Biol.* 22, 101–198.
- Almeida, M.J., Machado, J., Vieira Coelho, M.A., Soares da Silva, P., Cimbra, J., 1998. L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) secreted by oyster (*Crassostrea gigas*) mantle cells: functional aspects. *Comp. Biochem. Physiol.* 120 (B), 709–713.
- Alcaraz-Zulbedia, M., Rojas, P., Boll, C., Rios, C., 2001. Neuroprotective effect of acute and chronic administration of copper (II) sulfate against MPP⁺ neurotoxicity in mice. *Neurochem. Res.* 26 (1), 59–64.
- Andersson, H., Petersson-Grawé, K., Lindqvist, E., Luthman, J., Oskarsson, A., Olson, L., 1997. Low-level cadmium exposure of lactating rats causes alterations in brain serotonin levels in the offspring. *Neurotoxicol. Teratol.* 19 (2), 105–115.
- Brown, R., Newell, R., 1972. The effects of copper and zinc on the metabolism of *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 16, 108–116.
- Canova, S., Degan, P., Peters, L.D., Livingstone, D.R., Voltan, R., Venier, P., 1998. Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYPIA-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. *Mutat. Res.* 399, 17–30.
- Franchini, A., Rebecchi, B., Bolognani Fantin, A.M., 1999. Gill endocrine cells in the goldfish *Carassius carassius* var. *auratus* and their impairment following experimental lead intoxication. *Histochem. J.* 31 (8), 559–564.
- Gedeon, Y., Ramesh, G.T., Wellman, P.J., Jadhav, A.L., 2001. Changes in mesocorticolimbic dopamine and D1/D2 receptor levels after low level lead exposure: a time course study. *Toxicol. Lett.* 123, 217–226.
- Gies, A., 1986. Serotonin and dopamine as regulators of adenylate cyclase and relaxation in a smooth muscle of the mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 84 (1), 61–66.
- Goldberg, E.D., Bertine, K.K., 2000. Beyond the mussel watch-new directions for monitoring marine pollution. *Sci. Total Environ.* 247 (2–3), 165–174.
- Kemenes, G., 1997. *In vivo* neuropharmacological and *in vitro* laserablation techniques as tools in the analysis of neuronal circuits underlying behaviour in a molluscan model system. *Gen. Pharmac.* 29 (1), 7–15.
- Khan, I.A., Thomas, P., 2000. Lead and Aroclor 1254 disrupt reproductive neuroendocrine function in Atlantic croaker. *Mar. Environ. Res.* 50, 119–123.
- Lafuente, A., Marquez, N., Perez-Lorenzo, M., Pazo, D., Esquifino, A.I., 2001. Cadmium effects on hypothalamic–pituitary–testicular axis in male rats. *Exp. Biol. Med.* 226 (6), 605–611.
- Muneoka, Y., Fujisawa, Y., Matsuura, M., Ikeda, T., 1991. Neurotransmitters and neuromodulators controlling the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 98 (1), 105–114.
- Nemcsók, J., Hiripi, L., Patocska, M., Salánki, J., Kufksák, O., 1997. The effects of pesticides on monoaminergic system related to periodic activity of mussels (*Anodonta cygnea*). *Gen. Pharmac.* 29, 79–83.
- Pani, A.K., Croll, R.P., 1998. Pharmacological analysis of monoamine synthesis and catabolism in the scallop, *Placopecten magellanicus*. *Gen. Pharmac.* 31, 67–73.
- Prakash, N.T., Rao, K.S.J., 1995. Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalves *Perna viridis* during heavy metal exposure. *Mol. Cell. Biochem.* 146, 107–113.
- Ram, J.L., Moore, D., Putchakayala, A.A., Ma, D., Croll, R.P., 1999. Serotonergic responses of the siphons and adjacent mantle tissue of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 124, 211–220.
- Rademacher, D., Steinpreis, R.E., Weber, D.N., 2001. Short term exposure to dietary Pb and/or DMSA affects dopamine and dopamine metabolite levels in the medulla, optic tectum, and cerebellum of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pharm. Biochem. Behav.* 70, 199–207.
- Rao, K.S.J., Rao, S.B., Vishnuvardhan, D., Prasak, K.V.S., 1993. Alterations of superhelical state of DNA by aluminium (Al). *Biochim. Biophys. Acta* 1172, 17–20.
- Salánki, J., 1971. Control of periodicity by nonoscillating external factors in Pelecypoda. *J. Interdiscip. Cycle Res.* 2, 33–41.
- Salánki, J., Hiripi, L., 1990. Effect of heavy metals on the serotonin and dopamine systems in the central nervous system of the freshwater mussel (*Anodonta cygnea* L.). *Comp. Biochem. Physiol. C* 95 (2), 301–305.
- Viarengo, A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates—mechanisms of regulations and toxicity at cellular levels. *Crit. Rev. Aquat. Sci.* 1, 295–317.
- Viarengo, A., Pertica, M., Macinelli, G., Capelli, R., Orunesu, M., 1982. Effects of copper on nuclear RNA polymerase activities in the mussel digestive gland. *Mar. Biol. Lett.* 3, 345–352.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.* 44, 69–84.
- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E., Blasco, J., 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 277, R1612–R1619.

Synthesis of internal labeled standards of melatonin and its metabolite *N*¹-acetyl-*N*²-formyl-5-methoxykynuramine for their quantification using an on-line liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry system

Abstract: Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine) is implicated in physiologic changes related to light–dark cycles and has been recently found to display antioxidant properties. It is known that the reaction of melatonin with certain reactive oxygen and nitrogen species, such as hydrogen peroxide and singlet oxygen, produces *N*¹-acetyl-*N*²-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK). We report herein on the development of a new liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/ESI/MS-MS) assay to quantitatively determine melatonin and AFMK. The stable isotopic internal standard of melatonin-D₃ was synthesized by the reaction of 5-methoxytryptamine with deuterated acetyl chloride (CD₃COCl). Labeled AFMK (AFMK-D₃) was obtained after photooxidation of melatonin-D₃. The predominant ion [M + H]⁺ in the full scan mass spectra of melatonin, melatonin-D₃, AFMK and AFMK-D₃ were located, respectively, at *m/z* = 233, 236, 265 and 268. The collision-induced dissociation of the molecules revealed a predominant fragment at *m/z* = 174 for melatonin and melatonin-D₃ (loss of the *N*-acetyl group), and at *m/z* = 178 for AFMK and AFMK-D₃ (loss of both the *N*-acetyl and the *N*-formyl groups). The *m/z* transitions from 233 to 174 (melatonin), from 236 to 174 (melatonin-D₃), from 265 to 178 (AFMK), and from 268 to 178 (AFMK-D₃) were therefore chosen for the multiple reaction monitoring detection experiments, ensuring a high specificity and an accurate quantification of melatonin and AFMK in human plasma.

**Eduardo A. Almeida,
Clécio F. Klitzke,
Glaucia R. Martinez,
Marisa H. G. Medeiros
and Paolo Di Mascio**

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Key words: human plasma, labeled internal standard, mass spectrometry, melatonin, *N*¹-acetyl-*N*²-formyl-5-methoxykynuramine

Address reprint requests to Paolo Di Mascio, Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, C.P. 26077 – CEP 05513-970, São Paulo, SP, Brasil.
E-mail: pdmascio@iq.usp.br

Received July 21, 2003;
accepted September 25, 2003.

Introduction

Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine), a compound synthesized in the pineal gland and retina, has been demonstrated to mediate many physiologic, endocrinologic and behavioral processes [1]. Moreover, melatonin is known to exhibit antioxidant properties, as there is strong evidence that melatonin counteracts the deleterious effects of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively) in different systems [2–5]. The product of the interaction of melatonin with hydrogen peroxide (H₂O₂) and singlet molecular oxygen [O₂ (¹Δ_g)] was recently identified by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC/MS) in combination with nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, as being *N*¹-acetyl-*N*²-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) [6–8] (Fig. 1).

AFMK is a rarely investigated biogenic amine, and its physiologic role and level in organisms remains unknown, despite its presence in brain was proposed by Hirata et al. [9]. AFMK has been found to counteract the deleterious

effects of ROS/RNS in different systems [10], suggesting that this biogenic amine plays an antioxidant role. Moreover, it was recently demonstrated that immune responsive cells can oxidize melatonin, producing AFMK, and an important role was proposed for this reaction in the inflammatory response, probably through a signaling process involving the generation of intermediate electronic excited species, although this proposal has yet to be studied [11–13].

As melatonin and its metabolites are perceived as potential tools in the study of oxidative stress and the immune response in organisms, the development of sensitive and selective methods that allow for the precise detection of these compounds in tissues and fluids of animals is necessary. A variety of analytical methods to determine melatonin levels in biologic samples have been described, including bioassay, fluorimetry, HPLC with electrochemical or fluorimetric detection, radioimmunoassay and liquid or gas chromatography coupled to mass spectrometry [14–16]. However, no reports are available on methodologies to determine the levels of melatonin metabolites in organisms, especially AFMK, a major product of

Fig. 1. Synthesis of labeled melatonin-D₃ through the reaction of 5-methoxytryptamine with deuterated acetyl chloride in dry dichloromethane, and in the presence of dry triethylamine. AFMK-D₃ was obtained after photosensitization of melatonin-D₃ with methylene blue.

melatonin, which is generated by its interaction with H₂O₂ and O₂ (¹Δ_g) in vitro. In this paper, we describe the development of an accurate liquid chromatography tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) analyses methodology for the detection of melatonin and AFMK in human plasma samples, using labeled melatonin and AFMK as synthesized internal standards.

Materials and methods

Chemicals

All the chemicals employed were of the highest purity commercially available. 5-Methoxytryptamine (5MT), deuterated acetyl chloride (CD₃COCl), melatonin, triethylamine, and Chelex[®] 100 resin were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Methanol, dichloromethane, ethyl acetate, and methylene blue were supplied by Merck KgaA (Darmstadt, Germany). Acetone was obtained from Labsynth Ltd. (São Paulo, Brazil). The water used in all the experiments was purified with a Millipore Milli-Q system (Bedford, MA, USA).

Synthesis and purification of the labeled melatonin and AFMK

Deuterated melatonin (melatonin-D₃) was synthesized through the reaction of 5MT with CD₃COCl, according to Fig. 1. About 0.190 g (1 mmol) of 5MT was diluted in 1 mL of dry dichloromethane and 0.21 mL (1.5 mmol) of dry triethylamine, and 0.09 mL (1.2 mmol) of CD₃COCl was then added to the solution and stirred at room temperature in a nitrogen atmosphere. The reaction was monitored by thin layer chromatography (TLC), running small aliquots of the solution at 30-min intervals, in parallel with 5MT and melatonin standards, and using ethyl acetate as the mobile phase.

Deuterated AFMK (AFMK-D₃) was obtained by photosensitization of the melatonin-D₃ in methylene blue, as previously described [8]. Briefly, melatonin-D₃ was diluted (1 mM) in 1 mL of water containing 20 μL of 6 mg/mL methylene blue solution. This solution was then bubbled with oxygen and exposed to a 500 W tungsten lamp for 2 hr on ice. After this procedure, methylene blue was extracted with Chelex[®] 100.

AFMK-D₃ was purified by a HPLC system consisting of two LC-10ADVP pumps, a SPD-M10AVP photodiodearray with wavelength ranging from 370 to 200 nm and an SCL-10AVP system controller, and monitored by Class-VP 5.032 software (Shimadzu, Kyoto, Japan). A semi-preparative Luna 10 C-8 (2) column (250 × 10 mm, 10 μm particle size) was utilized to separate AFMK-D₃ from the remaining melatonin and other compounds formed during the photosensitization process, with a gradient of 20–40% methanol in water for 20 min, and 40–20% for an additional 5 min, at a flow rate of 4.7 mL/min.

HPLC coupled to electrospray ionization/mass spectrometry (HPLC/ESI/MS) analyses

HPLC/ESI/MS analyses in the positive mode were carried out on a Quatro II mass spectrometer (Micromass, Altrincham, UK), whose cone voltage and source temperature were adjusted to 25 V and 100°C, respectively. The flow rates of the drying and nebulizing gas were optimized at 300 and 15 L/hr. The capillary potential and high electrode potential were set to 3.5 and 0.5 kV, respectively. Full scan spectra were acquired over a mass range of 120–270 *m/z* for melatonin and melatonin-D₃, and 120–400 *m/z* for AFMK.

Fig. 2. Full scan spectra of melatonin (A) and melatonin- D_3 (B). The conditions were as described in the Materials and methods section.

and AFMK- D_3 , with a dwell time of 1 s. For the collision-induced dissociation of the compounds, the collision energy of the mass spectrometer was set at 15 V.

The HPLC system consisted of two LC-10AD pumps and an SCL-10A system controller (Shimadzu). An analytic Phenomenex MercuryMS column (20×4.0 mm, $5 \mu\text{m}$ particle size) connected to a precolumn was used to separate the compounds. The mobile phase was a gradient of 10–40% acetonitrile in water during 10 min, and 40–10% for an additional 5 min, at a flow rate of 0.2 mL/min. The data were processed using the Mass Lynx NT data system, version 3.2 (Micromass).

Preparation of human plasma

Human plasma (500 mL) was obtained from a plasma bank, and 1-mL aliquots of this plasma were used for the extractions of melatonin and AFMK. A quantity of 1 pmol of AFMK- D_3 and 1 pmol of melatonin- D_3 were

added to the plasma aliquots before the extractions, and 1 mL of dichloromethane was then added to the aliquots in order to extract melatonin, AFMK, melatonin- D_3 , and AFMK- D_3 from the plasma. The solution was vortexed several times and centrifuged (1000 g during 3 min). The dichloromethane phase was then collected and dried under a nitrogen atmosphere and the residue re-suspended in 100 μL of pure methanol. A volume of 70 μL of this solution was injected into the HPLC/ESI/MS-MS system.

Preparation of the standard calibration curves

Standard calibration curves of both AFMK and melatonin were constructed with a 'clean' plasma (free of residual levels of MEL and AFMK), which was previously prepared. Briefly, dichloromethane (100 mL) was added to 100 mL of a separated human plasma aliquot, which was then vortexed several times to extract all residual levels of melatonin and

Fig. 3. Full scan spectra of AFMK (A) and AFMK-D₃ (B). The conditions were as described in the Materials and methods section.

AFMK from the plasma. The dichloromethane phase was discarded and the procedure repeated twice.

After this procedure, 1 pmol of both AFMK-D₃ and melatonin-D₃ was added to each of the five aliquots of 1 mL of the 'clean' human plasma. After this, standards of unlabeled AFMK and melatonin were added to each of the five aliquots at the following increasing concentrations, respectively: 0.5 and 0.1 pmol, 1 and 0.5 pmol, 3 and 1 pmol, 5 and 3 pmol, and 10 and 5 pmol. The curves for melatonin and AFMK were obtained by plotting the relative ratio of unlabeled ions to the isotopically D₃-labeled ions.

Results and discussion

In this paper, we report on the development of a new HPLC/ESI/MS-MS assay for the quantitative determination of melatonin and AFMK in biologic samples, as well as the synthesis of labeled melatonin-D₃ and AFMK-D₃ for its use as an internal standard in the assay. After 1.5 hr of the reaction of 5MT with CD₃COCl, practically all the 5MT was consumed, forming a product with same retention

fraction (RF) on the TLC as the melatonin standard (RF = 0.7). The reaction was then stopped and the melatonin-D₃ was recrystallized in acetone. The amount of melatonin-D₃ resulting from this procedure was calculated, based on its molar extinction coefficients, at close to 0.8 mmol ($\epsilon_{223 \text{ nm}} = 27,550$, and $\epsilon_{278 \text{ nm}} = 6300$ in water), representing a yield of 80% of melatonin-D₃ formation.

Fig. 2A depicts the mass spectrum of a melatonin standard, showing the main signals at $m/z = 233$ for the parental ion of melatonin ($[M + H]^+$) and 174 for the fragment generated as a result of the high cone voltage used ($[(M - N\text{-acetyl}) + H]^+$). Fig. 2B shows the mass spectrum of the product formed after the reaction of 5MT with CD₃COCl, revealing the formation of a product with main signals at $m/z = 236$ for the parental ion of melatonin-D₃ ($[(M + 3) + H]^+$), i.e. 3 Da greater than those of the unlabeled melatonin, as well as the fragmented moiety generated (see Fig. 2A).

The photosensitization of 1 mM melatonin-D₃ in methylene blue yielded 1 mL of AFMK-D₃ at a concentration of 532 μM ($\epsilon_{338 \text{ nm}} = 3600$, in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0), representing an output of 53%. Fig. 3A,B shows the mass

Fig. 4. Daughter ions generated by the collision-induced dissociation of melatonin (A) and melatonin-D₃ (B). The conditions were as described in the Materials and methods section.

spectra of AFMK and AFMK-D₃, indicating main signals at $m/z = 165$ and 168 , respectively, for AFMK and AFMK-D₃, which was 3 Da greater than the corresponding unlabeled AFMK.

After obtaining the full mass spectra of the compounds, the compounds were submitted to collision-induced dissociation to obtain the typical fragments generated for each compound. Fig. 4A,B shows the daughter ions for melatonin and melatonin-D₃, respectively, indicating that the two compounds produced the same fragment at $m/z = 174$, which represents loss of the *N*-acetyl group from melatonin, AFMK and AFMK-D₃ also generated the same main fragment at $m/z = 178$, representing loss of both the *N*-acetyl and the *N*-formyl groups in the collision cell (Fig. 5A,B).

Based on these data, the m/z transitions from 233 to 174 (melatonin), from 236 to 174 (melatonin-D₃), from 265 to 178 (AFMK), and from 268 to 178 (AFMK-D₃) were chosen for the Multiple Reaction Monitoring (MRM) detection experiments, ensuring a high specificity and an accurate quantification of melatonin and AFMK in biologic samples.

Fig. 6 shows the standard calibration curve obtained from the 'clean' human plasma by the above-described procedure. The curves were constructed from six different concentration points by plotting the chromatographic peak area ratios of the unlabeled standard vs. the D₃-labeled standard. The amount of labeled standards was kept constant at 1 pmol, and the amount of unlabeled standards varied according to the levels expected from samples. Blank

Fig. 5. Daughter ions generated by the collision-induced dissociation of AFMK (A) and AFMK-D₃ (B). The conditions were as described in the Materials and methods section.

injections (sample solvents plus 1 pmol of the respective D₃-labeled standard) under the same conditions revealed that no carryover of the native unlabeled standards from previous analyses occurred. These injections also indicated that the D₃-labeled internal standards were uncontaminated with any detectable level of the unlabeled compounds.

In Fig. 7, we show the detection of both AFMK and melatonin by the HPLC/ESI/MS methodology described herein, in the MRM mode, in a human plasma sample. As can be seen, both AFMK and melatonin were detected in human plasma with high sensitivity and specificity.

Pawlak et al. [17] recently reported a level of 1.6 pmol/mL of the main kynurenine metabolite of tryptophan in rat plasma compared with levels of 39.1 pmol/mL

for tryptophan. This represents a rate of 4% of the kynurenine metabolite in relation to the level of tryptophan. Using our new methodology, we detected levels of 0.2 pmol AFMK and 1.6 pmol melatonin in the human plasma sample, representing a proportion of 13% of AFMK compared with the concentration of melatonin in human plasma. These data are not representative and cannot be used as an index to reflect the normal physiologic levels in human plasma; however, they do suggest a great potential for the use of this methodology to simultaneously determine both AFMK and melatonin in vivo or in vitro.

Further studies are ongoing to evaluate the deacetylation product of AFMK (*N*-acetyl-5-methoxykynuramine, AMK), in human plasma, as it has been proposed that

AMK is a major product of melatonin degradation in rat brain [9]. In addition, according to Tan et al. [6], the enzyme catalase is able to catalyze the deformylation of

AFMK to AMK in vitro. Thus, the preparation of D₃-labeled AMK for use as an internal standard for the in vivo evaluation of the metabolism through the assay described herein is currently under study in our laboratory.

Acknowledgments

This work was financially supported by the Brazilian entities FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, CNPq – Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico, PRONEX/FINEP – Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência, and the Pró-Reitoria de Pesquisa of USP – University of São Paulo. E.A.A. and G.R.M. are recipients of FAPESP fellowships.

References

1. TAMARKIN L, BAIRD CJ, ALMEIDA OF. Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? *Science* 1985; **227**:714–720.
2. TAN DX, CHEN LD, POEGGELER B et al. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; **1**: 57–60.
3. REITER RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998; **56**: 359–384.
4. REITER RJ, TAN D-X, MANCHESTER LC et al. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Cell Biochem Biophys* 2001; **34**:237–254.
5. ALLEGRA M, REITER RJ, TAN DX et al. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res* 2003; **34**:1–10.
6. TAN D-X, MANCHESTER LC, REITER RJ et al. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Rad Biol Med* 2000; **29**:1177–1185.
7. CARAMPIN P, ROSAN S, DALZOPPO D et al. Some biochemical properties of melatonin and the characterization of a relevant

Fig. 6. HPLC/ESI/MS-MS calibration curve obtained for AFMK (A) and melatonin (B) by plotting the relative area ratios of increasing concentrations of the unlabeled compounds vs. 1 pmol of their respective D₃-labeled standard.

Fig. 7. Detection of AFMK and melatonin in human plasma by the HPLC/ESI/MS-MS methodology described in this work, in the multiple reaction monitoring mode. Conditions were as described in the Materials and methods section.

- metabolite arising from its interaction with H_2O_2 . J Pineal Res 2003; **34**:134–142.
8. ALMEIDA EA, MARTINEZ GR, KLITZKE CF et al. Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen (O_2 ($^1\Delta_g$)) produces N^1 -acetyl- N^2 -formyl-5-methoxykynurenine. J Pineal Res 2003; **35**:131–137.
 9. HIRATA F, HAYAISHI O, TOKUYAMA T et al. *In vitro* and *in vivo* formation of two new metabolites of melatonin. J Biol Chem 1974; **249**:1311–1313.
 10. TAN D-X, MANCHESTER LC, BURKHARDT S et al. N^1 -acetyl- N^2 -formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. FASEB J 2001; **15**:2294–2296.
 11. XIMENES VF, CAMPA A, CATALANI LH. The oxidation of indole derivatives catalyzed by horseradish peroxidase is highly chemiluminescent. Arch Biochem Biophys 2001; **387**:173–179.
 12. XIMENES VF, CATALANI LH, CAMPA A. Oxidation of melatonin and triptophan by HRP cycle involving compound III. Biochem Biophys Res Commun 2001; **287**:130–134.
 13. RODRIGUES MR, RODRIGUEZ D, CATALANI LH et al. Interferon-gamma independent oxidation of melatonin by macrophages. J Pineal Res 2003; **34**:69–74.
 14. RALPH CL, LYNCH HJ. A quantitative melatonin bioassay. Gen Comp Endocrinol 1970; **15**:334–338.
 15. MILLER FP, MAICKEL RP. Fluorometric determination of indole derivatives. Life Sci 1970; **9**:747–752.
 16. HARUMI T, MATSUSHIMA S. Separation and assay methods for melatonin and its precursors. J Chromatogr B 2000; **747**:95–110.
 17. PAWLAK D, TANKIEWICS A, MATYS T et al. Peripheral distribution of kynurenine metabolites and activity of kynurenine pathway enzymes in renal failure. J Physiol Pharmacol 2003; **54**:175–189.