AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESTUDOS IN VITRO DA GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS
HEPÁTICAS DA FORMAÇÃO DE 2-ALCILCICLOBUTANONAS RESULTANTES DA
IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS QUE CONTENHAM GORDURA**

ANGÉLICA BUENO BARBEZAN

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientadora:

Profa. Dra. Anna Lucia C. H. Villavicencio

São Paulo

2017

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDOS IN VITRO DA GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS
HEPÁTICAS DA FORMAÇÃO DE 2-ALCILCICLOBUTANONAS RESULTANTES DA
IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS QUE CONTENHAM GORDURA**

ANGÉLICA BUENO BARBEZAN

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientadora:
Profa. Dra. Anna Lucia Casañas Haasis
Villavicencio**

Versão Corrigida

**São Paulo
2017**

Dedico esta tese principalmente ao meu marido Rogério Barbezán que esteve ativamente presente em cada instante da criação deste trabalho, com toda certeza do mundo sem você nada disso teria sido possível. E também a todos que de alguma forma colaboraram para a realização desta pesquisa.

Agradecimentos

A produção de um trabalho científico exige muito de todos que se comprometem a fazê-lo, seja fisicamente, espiritualmente e principalmente mentalmente, existem provas surreais que passamos no decorrer de todo processo, as oscilações de astral e energia te leva do céu ao inferno constantemente e tentar se manter em equilíbrio é algo totalmente desafiador, mas confesso que hoje posso dizer que é algo passageiro, caso não desista do caminhar verá que existe sim vida após todas as tribulações de uma pós graduação, mesmo as vezes acharmos que não! Eu no decorrer de todos esses anos presenciei muito tipo de situações extremas que podemos chegar, porém encontrei também pessoas maravilhosas, verdadeiros seres de luz (outros nem tanto que não serão mencionados, porém jamais esquecidos) que gostaria de agradecer que mesmo subconscientemente me ajudaram a concluir com sucesso essa minha jornada.

Em primeiro lugar é lógico a Deus, porque tenho a certeza plena e absoluta que Ele é tudo!

Aos meus pais Cleusa Bueno e Sérgio Pompilio que nunca mediram esforços para me ajudar e auxiliar e muito nessa minha estrada.

Ao meu marido Rogério Barbezán que na minha opinião mereceria ganhar o título junto comigo porque sua participação direta e indireta em tudo foi fundamental, eu te amo!

Aos meus filhotes, Theo, Erik e Wesley que são a melhor parte da minha vida.

Aos amigos que fiz durante esses últimos anos no Centro de Tecnologia das Radiações – CTR e no Centro de Radiofarmácia - CR e espero levar para toda vida, Alexandra Nogueira, Ana Paula Nunes de Sá, Msc Ana Funari, Dra. Amanda Koike, Msc Camila Amorim, Dra. Daniele Seo Ieda, Dra. Erica Oliveira, Dr. Flavio Tihara, Jaqueline Jamara, Luiza Ferreira, Msc Natanael Silva, Dra Patrícia Martins, Dra Patrícia Takinami, Regiane Martins, Dra Renata Costa e Dr Renato Duarte.

Não poderia deixar de agradecer a outras pessoas queridas do CTR que também nunca mediram esforços em me ajudar, Sr. Araújo, aos secretários Claudia e Marcos Cardoso, pesquisadora Prof. Dra. Mônica Mathor, e ao Msc Thomaz de Miranda muito obrigada!

Ao Dr. João Alberto Osso Junior, orientador do mestrado, que mesmo a milhas e milhas distante também me auxiliou quando necessitei.

Gratidão a galerinha do CB – Centro de Biotecnologia do IPEN prof. Dr. Daniel Perez, Luma Ramirez, Kleicy Cavalcante por toda colaboração e conhecimentos adquiridos.

Ao pessoal do Instituto de Ciências Biomédicas – ICB/USP Prof.^a Dra. Gláucia Maria Machado-Santelli, Dr. Adam Arai Martens (Adam Sklodowska), Prof.^a Msc Bianca Rocha, Stephanie Carvalho e Msc Marcelo Medina de Souza por todos os ensinamentos, paciência, parceria e coleguismo.

Aos queridos do Centro do Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear – CDTN em MG, Msc Ana Carolina A. Bispo e ao Msc Bruno Mendes por toda dedicação e ensinamentos principalmente se tratando do “ames terapia” e por me mostrarem os pontos positivos de Belo Horizonte (brincadeirinha).

Aos meus amigos de sempre, Tatiane Leandro de Souza e Cleusa Silva pelo carinho e pelos doces momentos que me proporcionam.

Ao Dr. Geraldo Squilassi (in memoriam) que durante os últimos 3 anos me ajudou psicologicamente com muito diálogo e/ou com mágicos medicamentos para manter-me firme quando por dentro o mundo parecia desmoronar, e agora ao Dr. Paulo Renato Bentivegna e Dra Izabel C. S. Vieira agradecimentos eternos.

Imensa gratidão ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN por deste o estágio quando ainda cursava a graduação até hoje quando encerro o doutorado por me proporcionar oportunidades de aprender praticamente tudo que hoje sei.

E por fim a minha orientadora Prof.^a Dra. Anna Lucia C. H. Villavicencio que com sua personalidade impar me impulsionou a desenvolver, literalmente a meter a cara na dificuldade e buscar por aquilo que quer e precisa e que no final tudo dará certo, obrigada, obrigada e obrigada!

Entre a Áustria e a Itália há uma parte nos Alpes chamada Semmering. É uma região de montanhas muito íngreme e alta. Assentaram os trilhos nessa parte dos Alpes para ligar Viena e Veneza. Assentaram os trilhos antes mesmo que houvesse trem para percorrer o trajeto. Construíram porque sabiam que um dia o trem chegaria.

(Sob o Sol da Toscana)

ESTUDOS *IN VITRO* DA GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS HEPÁTICAS DA FORMAÇÃO DE 2-ALCILCICLOBUTANONAS RESULTANTES DA IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS QUE CONTENHAM GORDURA

Angélica Bueno Barbezan

RESUMO

A irradiação de alimentos já foi aprovada e vem sendo utilizada em diversos países para aplicações e finalidades de uma ampla variedade de alimentos. Seus benefícios abrangem o aumento do prazo de validade, melhoria de higiene dos alimentos e consequentemente menor deterioração e perdas se comparado com alimentos que não sofrem radiação. Além disto, os alimentos após irradiados apresentam-se seguros em termos nutritivos e de redução de patógenos. Porém, alimentos que contem de médio a alto teor de gordura induzem a formação de um subproduto denominado 2-Alcilociclobutanonas, a qual sabemos que parte destes compostos ingeridos são normalmente excretados através das fezes, porém parte permanece depositada nos tecidos adiposos. Trabalhos realizados com estes compostos anteriormente apresentaram efeitos citotóxicos e genotóxicos em células de cólon. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos citotóxicos realizados em testes de viabilidade celular, testes genotóxicos em micronúcleo e testes mutagênicos com a técnica de Ames em condições experimentais *in vitro* dos compostos 2-dDCB e 2-tDCB. Para isso, o fígado foi o órgão de escolha para avaliar os possíveis efeitos destes compostos, uma vez que este órgão é geralmente acometido pelo acúmulo de gordura. Foram utilizadas três linhagens hepáticas: HepG2, BRL3A e HTC. A análise dos resultados da viabilidade celular, revelou que as 2-dDCBs apresentaram discreto efeito citotóxico na concentração de 500 μM e as 2-tDCBs apresentaram danos baixos a partir de 100 μM e maiores em 500 μM , mostrando ser dose dependentes. Nos resultados de mutagenicidade, os compostos não apresentaram quaisquer efeitos mutagênicos nas concentrações e doses utilizadas, detectados pelo teste de Ames. Por fim, o ensaio de micronúcleo correspondeu às expectativas não demonstrando efeitos genotóxicos na linhagem, doses e tempos testados. Com base nos resultados atingidos, as 2 ACBs podem ser consumidas com relativa segurança, sob a ótica de possíveis efeitos mutagênicos e genotóxicos nas concentrações avaliadas.

***IN VITRO* STUDIES OF GENOTOXICITY AND CYTOTOXICITY IN HEPATIC CELLS OF 2-ALKYLCYCLOBUTANONES FORMATION RESULTING FROM IRRADIATION OF FOODS CONTAINING FAT**

Angélica Bueno Barbezan

ABSTRACT

Food irradiation has already been approved and has been used in several countries for applications and purposes of a wide variety of foods. Its benefits include increased shelf life, improved food hygiene and consequently less deterioration and losses compared to foods that do not undergo into radiation. In addition, food after irradiation is safe in terms of nutrients and pathogen reduction. However, foods that contain medium to high fat levels, induce the formation of a by-product called 2-Alkylcyclobutanones, which we know that part of these ingested compounds are normally excreted through the feces, but part remains deposited in the adipose tissues. Work performed with these compounds previously showed cytotoxic and genotoxic effects on colon cells. Thus, the objective of the present work was to investigate the cytotoxic effects performed in cell viability tests, genotoxic tests in micronucleus and mutagenic tests with Ames technique under *in vitro* experimental conditions of 2-dDCB and 2-tDCB compounds. Hence, the liver was the chosen organ to evaluate the possible effects of these compounds, since this organ is usually affected by accumulation of fat. Three hepatic cell lines were used: HepG2, BRL3A and HTC. Analysis of the cell viability results revealed that the 2-dDCBs presented a discrete cytotoxic effect at the concentration of 500 μM and the 2-tDCBs presented low damages from 100 μM and larger at 500 μM , showing to be dose dependent. In the mutagenicity results, the compounds did not show any mutagenic effects at the concentrations and doses used, detected by the Ames test. Finally, the micronucleus test corresponded to expectations demonstrating no genotoxic effects in the cell line, doses and times tested. Based on the results achieved, the 2 ACBs can be consumed with relative safety, from the perspective of possible mutagenic and genotoxic effects in the evaluated concentrations.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Irradiação de Alimentos.....	20
2. OBJETIVO.....	24
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
3.1 Alcilciclobutanonas – 2 ACBs.....	25
3.1.1 ACBs e o câncer.....	28
3.2 Fígado.....	30
3.2.1 Carcinoma Hepatocelular.....	30
3.3 Cultivo celular.....	33
3.3.1 Cultura Primária.....	33
3.3.2 Linhagens Celulares.....	34
3.4 Genotoxicidade.....	34
3.4.1 Teste de Genotoxicidade – Teste do Micronúcleo.....	34
3.5 Viabilidade Celular.....	40
3.5.1 Métodos utilizados para identificar a viabilidade celular.....	40
3.5.2 Viabilidade Celular e 2-ACBs.....	41
3.6 Mutagenicidade.....	44
3.6.1 Avaliação da Mutagenicidade – Teste de Ames.....	44
3.6.2 Estudos realizados de mutagenicidade das 2-ACB utilizando o teste de Ames.....	46
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.1 Material.....	48
4.1.1 Substância Teste - Compostos 2-ACBs e Soluções.....	48
4.1.1.1 Soluções utilizadas para o cultivo de células nos testes de micronúcleo e viabilidade celular.....	50
4.1.2 Linhagens Celulares.....	51
4.1.3 Soluções utilizadas no Ensaio de Micronúcleos.....	52
4.1.4 Soluções utilizadas no Teste de Ames.....	53
4.2 Métodos.....	55
4.2.1 Ensaio do Micronúcleo.....	55
4.2.1.1 Solubilização dos compostos testes.....	55
4.2.1.2 Linhagens utilizadas no ensaio.....	55
4.2.1.2.1 Protocolo de cultivo e manutenção das culturas das células HepG2, BRL3A e HTC.....	56

4.2.1.3	O Ensaio.....	56
4.2.1.3.1	Etapas de Lise.....	58
4.2.1.4	Análises Estatísticas.....	61
4.2.2	Teste de Viabilidade Celular.....	61
4.2.2.1	Avaliação da Citotoxicidade.....	62
4.2.2.2	Análises Estatísticas.....	63
4.2.3	Teste de Ames.....	63
4.2.3.1	Linhagens Utilizadas.....	63
4.2.3.2	Controle Negativo.....	64
4.2.3.3	Controle Positivo.....	64
4.2.3.4	O Ensaio.....	65
4.2.3.4.1	Doses Utilizadas.....	68
4.2.3.4.2	Fatores a serem avaliados.....	69
4.2.3.5	Análises Estatísticas.....	71
5.	RESULTADOS.....	72
5.1	Ensaio de Micronúcleo.....	72
5.1.1	Ensaio de Micronúcleo – Linhagem BRL3A.....	74
5.1.2	Ensaio de Micronúcleo – Linhagem HepG2.....	81
5.1.3	Ensaio de Micronúcleo – Linhagem HTC.....	88
5.2	Teste de Viabilidade Celular.....	95
5.2.1	Avaliação da 2-dDCB – 24h.....	95
5.2.2	Avaliação da 2-dDCB – 48h.....	96
5.2.3	Avaliação da 2-tDCB – 24h.....	96
5.2.4	Avaliação da 2-tDCB – 48h.....	97
5.3	Teste de Ames.....	99
5.3.1	Ilustrações do teste de Ames com 2-dDCB e linhagem TA-98.....	99
5.3.2	Ilustrações do teste de Ames com 2-tDCB e linhagem TA 100.....	103
5.3.3	<i>S. typhimurium</i> TA-98.....	106
5.3.4	<i>S. typhimurium</i> TA-100.....	107
5.3.5	<i>S. typhimurium</i> TA-1535.....	108
5.3.6	<i>S. typhimurium</i> TA-1537.....	109
5.3.7	<i>E. coli</i> WP2-uvrA.....	110
6.	DISCUSSÃO.....	111
7.	CONCLUSÃO.....	117
8.	ESTUDOS FUTUROS.....	118
	REFERÊNCIAS.....	119

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1	Formação da 2-ACB a partir de um triglicéride após irradiação..... 26
FIGURA 2	Estágios dos danos hepáticos, desde o fígado normal até um estado cirrótico onde já não há nenhuma possibilidade de reversão do processo..... 32
FIGURA 3	Micronúcleo formado..... 35
FIGURA 4	Formação do micronúcleo por meio de perda anafásica e quebra cromossômica..... 35
FIGURA 5	Componentes essenciais de um citômetro de fluxo e a identificação referente ao tamanho (Forward Scatter FSC) e granulosidade (Side Scatter SSC)..... 38
FIGURA 6	Embalagens comerciais das 2-ACBs apresentadas no mercado. 2-tDCB possui formato sólido (pó) e tem sensibilidade a luz, peso molecular 266,46 g/mol e 2-dDCB também possui forma sólida, geralmente vem aderida ao frasco, peso molecular 238,41 g/mol..... 48
FIGURA 7	Morfologia das linhagens (a) HTC, (b) BRL3A e (c) HepG2. Utilizada lente objetiva de 20x..... 52
FIGURA 8	Tubo cônico com meio de cultura e pellet celular formado ao fundo após centrifugação..... 57
FIGURA 9	Microplaca em gelo exposta a foto ativação..... 59
FIGURA 10	Microplaca no equipamento citômetro (BD CSampler – C6 Flow Cytometer) para análise do ensaio do MN..... 60
FIGURA 11	Estratégia de estudo. (a) remoção de detritos celulares; (b) remoção de duplicados; (c) região de Beads; (d) fluorescência mínima de SYTOX de 1/100 do núcleo de G1; (e) células mortas (EMA+) e (f) núcleo e regiões de micronúcleos..... 61
FIGURA 12	Microplaca de 96 poços sendo inserida no espectrofotometro - EON Microplate Proliferation Assay..... 62
FIGURA 13	Placas com top ágar solidificado e previamente identificadas..... 66
FIGURA 14	Placas com as respectivas linhagens bacterianas semeadas em incubação a 37°C pelo período de 48 horas..... 67
FIGURA 15	Demonstração das etapas envolvidas no procedimento de incorporação em placas do teste de mutação genética em bactérias..... 67
FIGURA 16	Contagem de 1/8 de uma placa com uma grande taxa de reversões no equipamento Colony Counter..... 70
FIGURA 17	Toxicidade induzida por DMSO na linhagem BRL 3A..... 73
FIGURA 18	Morte celular na linhagem BRL3A induzida por DMSO..... 73

FIGURA 19	MN formados após a linhagem receber o tratamento com os compostos 2-dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M. Colchicina, NaCl e CC foram utilizados como controles.....	74
FIGURA 20	% de células não viáveis (mortas) após a linhagem BRL 3A receber o tratamento com os compostos de 2-dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M no período de 4 horas.....	75
FIGURA 21	Relação de núcleos – Beads na linhagem BRL 3A exposta a 4h com os compostos 2-dDCB e 2-tDCB (100, 300 e 500 μ M).....	75
FIGURA 22	Controles utilizados: (a) Linhagem BRL3A sem receber nenhum tratamento, (b) Células tratadas somente com NaCl, (c) células tratadas com Colchicina.....	76
FIGURA 23	Linhagem BRL3A tratada com: (a) 100 μ M, (b) 300 μ M e (c) 500 μ M de 2-dDCB, período de incubação de 4 horas.....	76
FIGURA 24	Linhagem BRL3A tratada com: (a) 100 μ M, (b) 300 μ M e (c) 500 μ M de 2-tDCB, período de incubação de 4 horas.....	77
FIGURA 25	MN formados após a linhagem receber o tratamento com os compostos 2-dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M. Colchicina, NaCl e CC foram utilizados como controles. Período de incubação: 24 horas.....	78
FIGURA 26	% de células não viáveis (mortas) após a linhagem celular receber o tratamento com os compostos 2 dDCB e 2 tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M no período de 24 horas.....	78
FIGURA 27	Relação de núcleos-Beads na linhagem BRL 3A exposta a 24 horas com os compostos 2 dDCB e 2 tDCB (100, 300 e 500 μ M).....	79
FIGURA 28	Controles utilizados: (a) Linhagem BRL 3A sem receber nenhum tratamento (CC), (b) Células tratadas com NaCl, (c) células tratadas com Colchicina, período de incubação de 24 horas.....	79
FIGURA 29	Linhagem BRL3A tratada com: (a) 100 μ M, (b) 300 μ M e (c) 500 μ M de 2-dDCB, incubadas por um período de 24 horas.....	80
FIGURA 30	Linhagem BRL3A tratada com: (a) 100 μ M, (b) 300 μ M e (c) 500 μ M de 2-tDCB, incubadas por um período de 24 horas.....	80
FIGURA 31	MN formados após a linhagem HepG2 receber tratamento com os compostos 2 dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M, período de incubação de 4 horas. Colchicina, NaCl e CC (controle celular) foram utilizados como controles.....	81
FIGURA 32	% de células não viáveis (mortas) após a linhagem celular receber o tratamento com os compostos de 2 dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M no período de 4 horas.....	82
FIGURA 33	Relação de núcleos-Beads na linhagem HepG2 exposta a 4 horas com os compostos 2 dDCB e 2-tDCB (100, 300 e 500 μ M).....	82
FIGURA 34	Controles utilizados: (a) Linhagem HepG2 sem receber nenhum tratamento (CC). Na ponta da seta um bead encontrada, (b) Células tratadas com NaCl, (c) células tratadas com Colchicina. Na ponta da seta micronúcleo encontrado. Símbolo expresso em cruz indica célula morta..	83

FIGURA 35	Linhagem celular HepG2 tratada nas concentrações: (a) 100 μ M, (b) 300 μ M e (c) 500 μ M de 2-dDCB, período de incubação de 4 horas.....	83
FIGURA 36	Linhagem celular HepG2 tratada em concentrações: (a) 100 μ M, (b) 300 μ M (na ponta da seta de ambos, beads encontradas) e (c) 500 μ M 2-tDCB, período de incubação de 4 horas. Símbolo em cruz indica a presença de célula morta.....	84
FIGURA 37	MN formados após a linhagem HepG2 receber tratamento com os compostos de 2 dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M, período de incubação de 24 horas. Colchicina, NaCl e CC (controle celular) foram utilizados como controles.....	85
FIGURA 38	% de células não viáveis (mortas) após a linhagem celular receber o tratamento com os compostos de 2 dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M no período de 24 horas.....	85
FIGURA 39	Relação de núcleos-Beads na linhagem HepG2 exposta a 24 horas com os compostos 2 dDCB e 2-tDCB (100, 300 e 500 μ M).....	86
FIGURA 40	Controles utilizados: (a) Linhagem HepG2 sem receber nenhum tratamento (CC), (b) Células tratadas com NaCl, na ponta da seta micronúcleo encontrado (c) células tratadas com Colchicina, na ponta da seta bead localizada. Incubadas pelo período de 24 horas. Símbolo expresso em cruz indica célula morta encontrada.....	86
FIGURA 41	Linhagem celular HepG2 tratada nas concentrações: (a) 100 μ M, (b) 300 μ M e (c) 500 μ M de 2-dDCB, período de incubação de 24 horas. (Na ponta da seta micronúcleo encontrado). Símbolo em cruz indica célula morta.....	87
FIGURA 42	Linhagem celular HepG2 tratada em concentrações: (a) 100 μ M, na ponta da seta bead localizada, (b) 300 μ M, na ponta da seta micronúcleo encontrado e (c) 500 μ M 2-tDCB, símbolo em cruz indica célula morta. Período de incubação de 24 horas.....	87
FIGURA 43	MN formados após a linhagem HTC receber tratamento com os compostos de 2 dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M, período de incubação de 4 horas. Colchicina, NaCl e CC (controle celular) foram utilizados como controles.....	88
FIGURA 44	% de células não viáveis (mortas) após a linhagem celular HTC receber o tratamento com os compostos de 2 dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M no período de 4 horas.....	89
FIGURA 45	Relação de núcleos-Beads na linhagem HTC exposta a 4 horas com os compostos 2 dDCB e 2-tDCB (100, 300 e 500 μ M).....	89
FIGURA 46	Controles utilizados: (a) Linhagem HTC sem receber nenhum tratamento (CC), (b) Células tratadas com NaCl, na ponta de seta bead, (c) células tratadas com Colchicina, presença de micronúcleo indicada com a seta. Incubadas pelo período de 4 horas.....	90

FIGURA 47	Linhagem celular HTC tratada em concentrações: (a) 100 μ M, (b) 300 μ M e (c) 500 μ M 2-dDCB, período de incubação de 4 horas.....	90
FIGURA 48	Linhagem celular HTC tratada em concentrações: (a) 100 μ M, (b) 300 μ M, em ambas figuras, micronúcleo na ponta da seta e (c) 500 μ M, na ponta da seta bead, 2-tDCB, período de incubação de 4 horas.....	91
FIGURA 49	MN formados após a linhagem HTC receber tratamento com os compostos de 2 dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M, período de incubação de 24 horas. Colchicina, NaCl e CC (controle celular) foram utilizados como controles.....	92
FIGURA 50	% de células não viáveis (mortas) após a linhagem celular HTC receber o tratamento com os compostos de 2 dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M no período de 24 horas.....	92
FIGURA 51	Relação de núcleos-Beads na linhagem HTC exposta a 24 horas com os compostos 2 dDCB e 2-tDCB (100, 300 e 500 μ M).....	93
FIGURA 52	Controles utilizados: (a) Linhagem HTC sem receber nenhum tratamento (CC), (b) Células tratadas com NaCl, (c) células tratadas com Colchicina, incubadas pelo período de 24 horas. Na ponta da seta micronúcleo encontrado. Símbolo em cruz indica célula morta encontrada.....	93
FIGURA 53	Linhagem celular HTC tratada em concentrações: (a) 100 μ M, (b) 300 μ M e (c) 500 μ M 2-DDCB, período de incubação de 24 horas.....	94
FIGURA 54	Linhagem celular HTC tratada em concentrações: (a) 100 μ M, (b) 300 μ M e (c) 500 μ M 2-tDCB, período de incubação de 24 horas.....	94
FIGURA 55	Viabilidade nas linhagens BRL 3A, HepG2 e HTC após exposição a 2-dDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M. Resultados comparados ao controle, onde as células não receberam nenhum tratamento, considerado 100% de viabilidade. Período de incubação 24h (Valores expressos em %).	95
FIGURA 56	Viabilidade nas linhagens BRL 3A, HepG2 e HTC após exposição a 2-dDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M. Resultados comparados ao controle, onde as células não receberam nenhum tratamento, considerado 100% de viabilidade. Período de incubação 48h (Valores expressos em %).	96
FIGURA 57	Viabilidade nas linhagens BRL 3A, HepG2 e HTC após exposição a 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M. Resultados comparados ao controle, onde as células não receberam nenhum tratamento, considerado 100% de viabilidade. Período de incubação 24h (Valores expressos em %).	97

FIGURA 58	Viabilidade nas linhagens BRL 3A, HepG2 e HTC após exposição a 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M. Resultados comparados ao controle, onde as células não receberam nenhum tratamento, considerado 100% de viabilidade. Período de incubação 48h (Valores expressos em %).	98
FIGURA 59	Ilustração das taxas de reversões em placas do Teste de AMES para o composto 2-dDCB com a linhagem TA 98 COM sistema de ativação metabólica (S9). (A) Controle positivo; (B) Controle negativo; (C) Dose 1; (D) Dose 2 e (E) Dose 3.....	101
FIGURA 60	Ilustração das taxas de reversões em placas do Teste de AMES para o composto 2-dDCB com a linhagem TA 98 SEM sistema de ativação metabólica. (A) Controle positivo; (B) Controle negativo; (C) Dose 1; (D) Dose 2 e (E) Dose 3.....	102
FIGURA 61	Ilustração das taxas de reversões em placas do Teste de AMES para o composto 2-tDCB com a linhagem TA-100 COM sistema de ativação metabólica. (A) Controle positivo; (B) Controle negativo; (C) Dose 1; (D) Dose 2 e (E) Dose 3.....	104
FIGURA 62	Ilustração das taxas de reversões em placas do Teste de AMES para o composto 2-tDCB com a linhagem TA-100 SEM sistema de ativação metabólica. (A) Controle positivo; (B) Controle negativo; (C) Dose 1; (D) Dose 2 e (E) Dose 3.....	105

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 Trabalhos realizados para identificar danos genotóxicos das 2-ACBs utilizando os ensaios de cometa e micronúcleo.....	40
TABELA 2 Trabalhos realizados para avaliação do potencial citotóxico das 2-ACBs disponíveis na literatura a partir do ano de 1998 até 2017.....	42
TABELA 3 Trabalhos realizados para avaliação da mutagenicidade das 2-ACBs utilizando o Teste de Ames disponíveis na literatura a partir do ano de 2002 até 2017.....	47
TABELA 4 Resultados do teste de Ames para 2-dDCB utilizando a linhagem TA-98 de <i>S. typhimurium</i> , SEM e COM ativação metabólica.....	106
TABELA 5 Resultados do teste de Ames para 2-tDCB utilizando a linhagem TA – 98 de <i>S. typhimurium</i> , SEM e COM ativação metabólica.....	106
TABELA 6 Resultados do teste de Ames para 2-dDCB utilizando a linhagem TA – 100 de <i>S. typhimurium</i> , SEM e COM ativação metabólica.....	107
TABELA 7 Resultados do teste de Ames para 2-tDCB utilizando a linhagem TA – 100 de <i>S. typhimurium</i> , SEM e COM ativação metabólica.....	107
TABELA 8 Resultados do teste de Ames para 2-dDCB utilizando a linhagem TA – 1535 de <i>S. typhimurium</i> , SEM e COM ativação metabólica.....	108
TABELA 9 Resultados do teste de Ames para 2-tDCB utilizando a linhagem TA – 1535 de <i>S. typhimurium</i> , SEM e COM ativação metabólica.....	108
TABELA 10 Resultados do teste de Ames para 2-dDCB utilizando a linhagem TA – 1537 de <i>S. typhimurium</i> , SEM e COM ativação metabólica.....	109
TABELA 11 Resultados do teste de Ames para 2-tDCB utilizando a linhagem TA – 1537 de <i>S. typhimurium</i> , SEM e COM ativação metabólica.....	109
TABELA 12 Resultados do teste de Ames para 2-dDCB utilizando a linhagem WP2-uvrA de <i>E. coli</i> , COM ativação metabólica.....	110
TABELA 13 Resultados do teste de Ames para 2-tDCB utilizando a linhagem WP2-uvrA de <i>E. coli</i> , COM ativação metabólica.....	110

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1 Ácidos graxos, 2-ACBs geradas após processo de irradiação e exemplos de alimentos precursores de 2-ACBs.....	26
QUADRO 2 Formação de 2-ACBs em µg/g gordura/kGy em vários alimentos.....	27
QUADRO 3 Formação de 2-dDCBs em µM/peso total/dia.....	28
QUADRO 4 Linhagens de <i>S. typhimurium</i> e <i>E. coli</i> , tipos de reversões e alvo no DNA.....	64
QUADRO 5 Controles positivos utilizados em todas as linhagens estudadas, incluindo a concentração por placa nos ensaios com ausência de ativação metabólica.....	65
QUADRO 6 Controles positivos utilizados em todas as linhagens estudadas, incluindo concentração por placa nos ensaios na presença de ativação metabólica.....	65
QUADRO 7 Doses da 2-dDCB utilizadas no teste em mg/placa e valor aproximado em µM.....	68
QUADRO 8 Doses da 2-tDCB utilizadas no teste em mg/placa e valor aproximado em µM.....	68
QUADRO 9 Linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>E. coli</i> utilizadas no teste de Ames, e suas respectivas taxas basais.....	69
QUADRO 10 Resultados do efeito citotóxico em percentagem (%) do composto 2-dDCB em 24 e 48 horas.....	98
QUADRO 11 Resultados do efeito citotóxico em percentagem (%) do composto 2-tDCB em 24 e 48 horas.....	99

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

^{137}CS	Césio 137
$\mu\text{g/g}$	Micrograma/grama
μL	Microlitro
μM	Micro molar
μm	Micrômetro
2-ACB	2 Alcilciclobutanona
2-ACBs	2 Alcilciclobutanonas
2-DCB	2-dodecilciclobutanona
2-DDCB	2 Dodecilciclobutanona
2-tDCB	2 Tetradecilciclobutanona
2-tDdeCB	2-tetradeca-5'8'-dienylciclobutanone
2-tDeCB	2-tetradec-50-enylcyclo-butanone
^{60}Co	Cobalto – 60
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A-T	Adenina – Timina
BRL3A	Buffalo Rat Liver
C_1	Concentração 1
C10	Carbono10
C12	Carbono12
C14	Carbono14
C16	Carbono16
C18	Carbono18
C_2	Concentração 2
C6	Carbono 6
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Ácido cítrico
C8	Carbono 8
CAS	Chemical Abstracts Service
CB	Centro de Biotecnologia
CC	Controle Celular
CCS	Side Scatter
CDTN	Centro do Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CEN	Comitê Europeu de Normalização
Cetesb	Compania ambiental do Estado de São Paulo
CHC	Carcinoma Hepatocelular
Cm	Centímetros
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear

CO ₂	Dióxido de Carbono
D.O	Densidade Óptica
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
DNA	Deoxyribonucleic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMA	Etidium Monoaside
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FIG.	Figura
FSC	Forward Scatter
G	Grama
G2	Pós Síntese (ciclo celular)
G-C	Guanina – Citosina
HepG2	Human Caucasian Hepatocyte
HTC	Rat Hepatoma
HVB	Virus Hepatite B
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
INCA	Instituto do Câncer
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
K ₂ PO ₄	Fosfato de potássio dibásico
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Kilogramas
kGy	Kilogray
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potássio
LGM	Laboratório de Genotoxicidade em Microorganismos
M	Molar
MG	Minas Gerais
MgSO ₄ .H ₂ O	Sulfato de magnésio hidratado
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MN	Micronúcleo
MS	Espectometria de massa
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
N.D	Não detectado
Na ₂ NH ₂ PO ₄ .4H ₂ O	Fosfato de sódio e amônio tetrahidratado
NaCl	Cloreto de sódio
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NaHPO ₄	Fosfato de sódio anidro
NASH	Nonalcoholic steatohepatitis

Nmol	Nanomolar
°C	Graus centígrados
OECD	Economic Co-operation and Development
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Probabilidade
P.A.	Pró análise
P53	Proteína 53
PBS	Phosphate buffered saline
pH	Potential of hydrogen
q.s.p	Quantidade suficiente para
Ref	Referência
RNAse	Ribonuclease 3' pyrimidinooligonucleotidohydrolase
RPM	Rotação por minute
S	Síntese (ciclo celular)
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SUS	Sistema Único de Saude
U.K.	United Kingdom
UFC	Unidade formadora de colônia
USP	Universidade de São Paulo
V ₁	Volume 1
V ₂	Volume 2
WST-1	(2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)
XTT	2,3-bis[2-methoxy- 4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
Λ	Lambda

1 INTRODUÇÃO

1.1. Irradiação de Alimentos

O processamento por radiação em alimentos apresenta-se como um método seguro para a preservação e armazenamento de alimentos por longo prazo, quando comparada a outros métodos químicos de conservação de alimentos, os quais deixam resíduos tóxicos (Calucci et al., 2003; Roberts, 2014; FDA, 2015).

A evolução da tecnologia de irradiação é uma consequência de atividades de mais de 100 anos como um método de segurança alimentar, tornando-se assim a área mais pesquisada neste segmento. As evidências coletadas até o momento são suficientes para provar e estabelecer a segurança e a eficácia desta tecnologia (Ihsanullah e Rashid, 2017).

A irradiação de alimentos é aprovada para uso em mais de 60 países para aplicações e finalidades de uma vasta variedade de alimentos, principalmente como medida fitossanitária pós-colheita (CODEX, 2003; Breidbach e Ulberth, 2016).

Efeitos benéficos desta tecnologia resultaram em um número especial de vantagens práticas, em produtos que a aceitem, que incluem a versatilidade, amplo espectro eficaz contra bactérias, insetos e outras pragas. São penetrantes (alimentos são tratados em suas embalagens finais, organismos alvo não são protegidos pelo fato do produto estar embalado, e o tratamento dos produtos em “paletts” é possível). Dependendo de suas características, alimentos sólidos, preparados ou crus podem ser tratados. Esse tratamento não envolve produtos ou resíduos químicos, o processo é relativamente fácil de controlar (geralmente dependente somente da velocidade do transporte e a alimentação/atividade da fonte de radiação), e os alimentos podem ser imediatamente distribuídos na cadeia de abastecimento alimentar após o tratamento (Roberts, 2014).

O uso comercial da radiação ionizante para desinfestar produtos agrícolas exportados e/ou importados e que são considerados como expostos ao risco de infestação por pragas de quarentena, tem aumentando significativamente nos últimos anos, podendo ter um impacto extremo na facilitação do comércio internacional (Hallman e Loaharanu, 2016).

Não somente as indústrias e agricultores são beneficiados pela irradiação de alimentos. Em todo mundo pessoas com diversos problemas e complicações de saúde podem

se beneficiar desta tecnologia. Essas pessoas são suscetíveis a todos os tipos de complicações infecciosas de quaisquer microrganismos que podem estar presentes nos alimentos. A prevenção deste problema a este grande grupo de pessoas vulneráveis tem sido objeto de estudo constante. De 15-20 % desta população apresentam maior susceptibilidade às doenças transmitidas por alimentos do que a população em geral, mesmo em países desenvolvidos como o Reino Unido ou Estados Unidos (Lund et al., 2011; Farkas, 2016).

Por diversas razões, o tratamento de alimentos com radiação ionizante em doses controladas, aplicado a alguns alimentos finalmente vem se tornando realidade em muitos países. Os benefícios que incluem a melhoria na higiene, redução da deterioração e extensão do prazo de validade que varia de alimento para alimento são pontos cruciais e muito importantes porque mesmo que devidamente irradiados, eles permanecem saudáveis e seguros em termos nutritivos em prazos previamente determinados (Delincée, 2002; Ehlermann, 2009).

A irradiação de alimentos é realizada através da utilização de raios X provenientes de um acelerador de elétrons, feixes de elétrons acelerados ou radiação gama Cobalto-60 ou Césio-137 (^{60}Co ou ^{137}Cs) (Kim et al., 2004).

O tratamento realizado através da radiação quando utilizado para finalidade de redução da carga microbiana inibe a divisão celular nos microrganismos promovendo desta forma uma modificação estrutural molecular, então uma vez absorvido pelo material biológico, a radiação gama desenvolve um efeito direto e indireto sobre o material que recebeu este tratamento, desempenhando assim a função de desinfecção. A dose de irradiação varia com a aplicação (Kim et al., 2004; Fanaro et al., 2014).

A formação de 2-alcilciclobutanonas por ionização de diferentes triglicerídeos em dose alta (60 kGy) foi relatado pela primeira vez por Le Tellier e Nawar (1972). Mas esses autores não consideraram o uso dessas moléculas como marcadores de processamento de irradiação de alimentos. Na década de 80, realizou-se uma pesquisa extensiva que resultou no desenvolvimento de uma série de métodos de teste que podem ser utilizados para determinar de forma confiável o estado de irradiação de uma grande variedade de alimentos. Foi somente na década de 90, graças à melhoria da sensibilidade de técnicas analíticas, que demonstraram que as 2-alcilciclobutanonas formadas especificamente por radiólise, poderiam servir como teste para detecção de alimentos irradiados com doses maiores ou iguais a 1 kGy.

No final dos anos 90 e início dos anos 2000, o Comitê Europeu de Normalização (CEN) elaborou e normalizou uma série de métodos analíticos, para fiscalizar o

cumprimento da legislação sobre os alimentos irradiados. Desta forma a análise cromatográfica surgiu como um dos métodos de detecção das 2-alcilciclobutanonas em alimentos irradiados. Baseia-se na detecção de espectrometria de massa (MS) de 2-alcilciclobutanonas induzidas por radiação (2-ACBs) após a separação cromatográfica em gás. O método foi testado com sucesso em ensaios interlaboratoriais sobre frango cru, porco, ovo, salmão e Camembert (Breidbach e Ulberth, 2016). Todo este processo teve como princípio, não apenas a detecção das 2-ACBs nos alimentos irradiados, mas também especificar o campo de aplicação real e os limites de sua utilização (em função da dose aplicada de irradiação aos alimentos, seu teor de gordura e sua composição em termos de precursores de ácidos graxos) (Ndiaye et al., 1999).

Estas 2-alcilciclobutanonas provaram ser valiosos indicadores de processamento de irradiação de alimentos (Horvatovich, 2001). Sua formação foi relacionada à dose, ou seja, quanto maior a dose, maior será a formação das 2-ACBs (Crews et al., 2012), e também ao tipo de gordura que o alimento contém. As taxas de produção de 2-ACBs são influenciadas pela composição de ácidos graxos saturados e insaturados, ácidos graxos livres e triglicerídeos em alimentos. Por exemplo em ácidos graxo saturados forma-se a 2-dDCB (2-dodecilciclobutanona) e 2-tDCB (2-tetradecilciclobutanona), enquanto que nos ácidos graxos insaturados, 2-tDeCB (2-(tetradec-5'-enil)-ciclobutanona), 2-tD2eCB (2-(tetradeca-5',8'-dienil)-ciclobutanona) e 2-tD3eCB (2-(tetradeca-5'8'11'-trienil)-ciclobutanona) (Kim et al., 2004).

As concentrações de 2-ACBs nos alimentos são da ordem de partes por milhão, por exemplo, a quantidade de 2-dDCB (2-Dodecilciclobutanona), que é derivada do ácido palmítico, foi estimada em 12,9 µg por 100 g de carne de frango irradiada a 3 kGy (Yamakage et al., 2014).

A principal preocupação com relação ao consumo de alimentos irradiados é a promoção da pré-disposição ao desenvolvimento de mecanismos pró câncer por 2-ACB. Existem relatos sobre a toxicidade pelas evidências preliminares ao possível efeito genotóxico de 2-ACBs (Delincée e Pool-Zobel, 1998). Estudos completos dos possíveis efeitos da 2-ACBs em alimentos irradiados bem como seu(s) mecanismo(s) de ação em promover algum efeito tumoral são urgentemente necessários para responder às preocupações de saúde pública. A investigação aprofundada do efeito das 2-ACBs em níveis consumidos pela população humana e em modelos (*in vitro* e *in vivo*) de vários tipos de cânceres em tecidos diferentes, é extremamente importante antes de propor que os alimentos

irradiados podem ou não promover câncer de cólon ou outro tipo de câncer (Chinthalapally, 2003).

2 OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Verificar possíveis danos causados pelas 2-ACBs provenientes de alimentos irradiados que possuem de médio a alto teor de gordura, bem como os possíveis danos causados pelo seu potencial toxicológico, através de estudos específicos em condições experimentais *in vitro* em células hepáticas BRL 3A, HTC e HepG2.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Utilizando uma metodologia específica e diferenciada onde os micronúcleos (MN) são avaliados pela técnica de Ensaio de Micronúcleo (MN), através de um citômetro de fluxo, onde possíveis anomalias nucleares são identificadas com biomarcadores de eventos genotóxicos e de instabilidade cromossômica.
- ✓ Avaliar possíveis danos citotóxicos, utilizando a técnica de Teste de Viabilidade Celular (MTS) observando a influência de diversas concentrações das 2-Dodecilociclobutanonas (2-dDCB) e 2-Tetradecilociclobutanonas (2-tDCB) em diferentes tempos de incubação.
- ✓ Avaliar possíveis efeitos mutagênicos provocados pelos compostos químicos, neste caso em específico 2-ACBs por meio do Teste de Ames.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Alcilciclobutanonas – 2 ACBs

Alcilciclobutanonas (2-ACBs) são os únicos produtos radiolíticos formados a partir de alimentos que contenham triglicérides (ácidos graxos) e são submetidos a irradiação. 2-ACBs foram detectadas pela primeira vez em alimentos irradiados por Le Tellier e Nawar em 1972. Eles descobriram que quando os triglicerídeos contendo C6, C8, C10, C12, C14, C16, e C18 que eram sujeitos a irradiação no grupo 2 alcil das alcilciclobutanonas, eram substituídos e formavam os produtos radiolíticos.

Alcilciclobutanonas são compostos cíclicos formados pela perda de um elétron de oxigênio sobre a carbonila de um ácido graxo ou triglicérides, seguido por um processo de rearranjo para produzir a ionização e induzir a produção de radicais livres altamente ativos. Portanto, os ácidos palmíticos, esteárico, oleico, e linoleico, são os ácidos graxos primários presentes nos alimentos que quando tratados por processo de irradiação são transformados em 2-dDCB (2-Dodecilciclobutanona), 2-tDCB (2-Tetradecilciclobutanona), 2-tDeCB (2-tetradeca-5-enilciclo-butanona), e 2-tDdeCB (2-tetradeca-5'8'-dienilciclobutanona), respectivamente (Gadgil, 2002; Song, 2014) FIG. 1.

FIGURA 1 – Formação da 2-ACB a partir de um triglicéride após irradiação.

Fonte: Le-Tellier e Nawar (1972).

No quadro 1 podemos observar exemplos de alimentos bem como os ácidos graxos presentes que após serem expostos a irradiação geram os tipos de 2-ACBs correspondentes a cada ácido.

QUADRO 1 – Ácidos graxos, 2-ACBs geradas após processo de irradiação e exemplos de alimentos precursores de 2-ACBs

	Ácido Graxo	2-ACB Gerada	Sigla	Alimentos
C 10:0	Caprílico	2-hexil-ciclobutanona	2-HCB	Carnes; Manteiga; Coco
C 12:0	Láurico	2-octil-ciclobutanona	2-OCB	Óleo de Coco
C 14:0	Mirístico	2-decil-ciclobutanona	2-DCB	Gordura animal; Óleo de coco; Leite
C 16:0	Palmítico	2-dodecil-ciclobutanona	2-dDCB	Gordura animal; Óleo de palma
C 16:1	Palmitoleico	2-(dodec-5'-enil)-ciclobutanona	2-dDeCB	Óleo de Macadamia
C 18:0	Estearico	2-tetradecil-ciclobutanona	2-tDCB	Gordura animal e vegetais
C 18:1	Oleico	2-(tetradec-5'-enil)-ciclobutanona	2-tDeCB	Oliva, Óleo de oliva; Acabate
C 18:2	Linoleico	2-(tetradeca-5',8'-dienil)-ciclobutanona	2-tD2eCB	Óleos Vegetais
C 18:2	Linolênico	2-(tetradeca-5'8'11'-trienil)-ciclobutanona	2-tD3eCB	Óleo de Peixe

Fonte: Adaptação de Sommers et al., 2007.

Em um estudo realizado por Marchioni et al. (2009) foi detectado os rendimentos de produção das 2-ACBs em diferentes alimentos de origem vegetal, animal e frutos marinhos. No quadro 2 podemos observar estes alimentos analisados e a quantidade de 2-ACBs geradas após o processo de irradiação.

QUADRO 2 - Formação de 2-ACBs em µg/g gordura/kGy em vários alimentos

Alimentos	2-DCB	2-dDCB	2-tDCB	2-dDeCB	2-tDeCB
Leite em Pó	0.112	0.393	0.338	0.021	0.250
Avelã	N.D	0.132	0.043	N.D	1.357
Carne de Frango	0.006	0.342	0.118	0.072	0.806
Filé Bovino	0.037	0.767	0.649	0.090	1.350
Pasta de Fígado de Ganso	0.017	0.883	0.794	0.047	1.853
Sementes de Cacau	N.D	1.243	3.353	N.D	0.233
Hamburguer	0.026	0.409	0.355	0.031	0.501
Salmão Defumado	0.048	1.181	0.060	0.052	0.167
Pernas de Rã	0.021	0.175	0.086	N.D	0.039
Salmão	0.045	0.142	0.026	0.083	0.199
Abacate	N.D	0.740	N.D	N.D	0.444
Ovo inteiro Liquido	N.D	0.159	0.083	0.014	0.255

ND = Não Detectado

Fonte: Adaptação de Marchioni et al. (2009).

Os resultados deste estudo mostraram que a formação de várias 2-ACBs em alimentos que passaram pelo processo de irradiação geram aproximadamente 1.6 nmol de 2-ACB individual por mmol de ácido graxo precursor por kGy, qualquer que seja a 2-ACB e o alimento. Esta conclusão torna possível prever a quantidade de 2-ACBs gerados por irradiação. Por exemplo, a quantidade de 2-dDCB (ácido palmítico) em frango é aproximadamente 0,3 g em 1g de gordura de frango por kGy, levando em conta que o conteúdo de gordura no frango é de aproximadamente 10% e este frango foi tratado com uma dose de 3 kGy de radiação.

Após a carne de frango ser irradiada, a 2-dDCB é formada e compreende 20% do total de ácidos graxos presentes (Crone et al., 1992)

Após consumir 200 g de frango irradiado com 3 kGy, o consumidor terá ingerido 80 µg de 2-ACBs. Se o consumidor apresentar peso corporal médio de 70 Kg, isto resultaria numa exposição de aproximadamente 1µg de 2-ACBs por quilo de peso corporal.

Os níveis das 2-ACBs em alimentos irradiados não depende somente da dose aplicada e o teor de gordura, mas também da quantidade de ácidos graxos precursores (Marchioni et al., 2009).

Tomando por parâmetro os dados disponibilizados por Marchioni et al. (2009), foi realizada uma simulação da quantidade de 2-dDCB ingeridas a partir do consumo diário de carne bovina e de frango irradiadas, para um indivíduo com massa média corpórea de 70 Kg (Quadro 3).

QUADRO 3 - Formação de 2-dDCBs em μM /massa total/dia

Carne	Consumo/ dia	2-dDCB	2-dDCB (em μg)	Radiação kGy	% Gordura	Peso Corporal (Kg)	Exposição de 2dDCBs /quilo de peso corporal (em μg)	2-dDCB gerada em μM / peso total/ dia	2-dDCB gerada em μM / peso total/ mês
Bovina	200g	0,767	179,42	3	10%	70	2,56	0,75	22,58
Bovina	200g	1,534	358,83	6	10%	70	5,13	1,51	45,17
Bovina	200g	2,557	598,05	10	10%	70	8,54	2,51	75,25
Frango	200g	0,342	80,00	3	10%	70	1,14	0,34	10,07
Frango	200g	0,684	160,00	6	10%	70	2,29	0,67	20,13
Frango	200g	1,140	266,67	10	10%	70	3,81	1,12	33,60

3.1.1. ACBs e o câncer

Enquanto alimentos irradiados têm muitas propriedades benéficas conhecidas, o efeito de seu consumo a longo prazo permanece desconhecido e/ou pouco explorado. A falta de estudos críticos em abordar o impacto da exposição a longo prazo dos alimentos irradiados sobre doenças crônicas humanas, tais como doenças cardiovasculares, artrite ou vários tipos de cânceres é considerado como um problema. É muito importante resolver a questão do impacto sobre as doenças crônicas, em especial sobre o câncer, com metodologias científicas apropriadas. Todos os estudos realizados até o momento têm sido de curta duração para verificar o potencial carcinogênico de alimentos irradiados. Estudos sugerem que os compostos radiolíticos tais como 2-ACBs que são gerados exclusivamente em alimentos irradiados a partir dos ácidos graxos e triglicérides presentes nos alimentos podem favorecer o surgimento de câncer (Letellier e Nawar, 1972; Stevenson et al., 1990).

Vários fatores dietéticos, incluindo lipídios que variam em tipo e quantidade em ácidos graxos em sua composição de ácidos podem influenciar na patogênese do câncer de cólon, pois este tipo de patologia é totalmente influenciado por lipídeos na dieta que, inclusive, é o segundo tipo de câncer mais prevalente nos Estados Unidos, contribuindo para mortes entre homens e mulheres (Chinthalapally, 2003).

A principal preocupação com relação ao consumo de alimentos irradiados é se 2-ACBs podem ter algum efeito em promover o câncer. Existem alguns estudos sobre a toxicidade do 2-ACBs pelas evidências preliminares ao possível efeito genotóxico (Delincée e Pool-Zobel, 1998).

Uma variedade de testes referentes a estudos toxicológicos de curto prazo tem sido utilizados para avaliar o potencial genotóxico e citotóxico de aditivos alimentares e produtos químicos formado por tecnologias de processamento. Um destes testes é o do cometa, que foi concebido para detectar quebras na cadeia de DNA em bactérias, fungos ou células de mamífero através de um aumento na mobilidade electroforética que são formados por fragmentos de DNA resultantes de danos no DNA e fragmentação do cromossomo (Tice et al., 2000).

Em outros estudos utilizando o teste do cometa afirmou-se que 2-DCB induziu rupturas dos filamentos no DNA em roedores e células intestinais humanas, mostrando que o composto possuía um efeito genotóxico fraco (Delinceé e Pool-Zobel, 1998; Delinceé et al., 1999). O estudo recebeu uma grande atenção nos Estados Unidos devido à introdução de carne moída irradiada em um programa local “Escola Nacional Programa Almoço” a partir de 2004.

Alguns grupos de consumidores foram informados erroneamente que os resultados obtidos do ensaio do cometa mostraram que o 2-DCB foi mutagênico e que, portanto, alimentos irradiados podem causar câncer. Em contrapartida, uma criteriosa avaliação desses resultados (Delinceé e Pool-Zobel, 1998; Delinceé et al., 1999) por agências de regulamentações internacionais indicaram que a interpretação de que 2-DCB foi genotóxico não poderia ser apoiada com base nos dados e métodos utilizados (European Commission, 2002; Health Canada, 2003).

O teste do cometa, embora seja amplamente utilizado como um ensaio de rastreio, não tem sido validado para a detecção de genotoxinas fracas e podem produzir resultados falso-positivos devido à degradação do cromossomo que ocorre como um resultado da morte celular genotóxica (Sommers et al., 2004) e além do mais o teste do cometa detecta lesões primárias que muitas vezes são reparáveis, não sendo desta forma o mais indicado para avaliar danos genotóxicos (Severin et al., 2003).

Para avaliar com mais precisão o potencial genotóxico da 2-ACBs, o mais indicado neste caso é o teste de micronúcleo, por esta razão foi o teste de escolha para avaliar possíveis danos causados pela genotoxicidade.

Estudos completos dos possíveis efeitos da 2-ACBs em alimentos irradiados e o(s) seu(s) mecanismo(s) de ação em promover o câncer, são urgentemente necessários para responder às preocupações de saúde pública. A investigação aprofundada do efeito de 2-ACBs em níveis consumidos pela população humana em modelos (*in vitro* e *in vivo*) de vários tipos de cânceres (principalmente os que podem surgir no trato digestório devido ao

acúmulo de gordura visceral) é extremamente importante, antes de propor que os alimentos irradiados possuam ou não efeito promotor no câncer de cólon, como já sugerido, ou outro tipo de câncer (Chinthalapally, 2003).

Por esta e outras importantes razões escolhemos o fígado para verificar o efeito da ação das 2-ACBs em estudos experimentais *in vitro*, uma vez que o órgão é comumente acometido pelo acúmulo de gordura e já é de conhecimento que parte das 2-ACBs ingeridas ficam depositadas em tecidos adiposos.

3.2 - Fígado

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo: no homem adulto mediano pesa cerca de 1.500 g, e encontra-se situado na cavidade abdominal, abaixo do diafragma, é formado por dois lobos: um lobo direito e um lobo esquerdo menor, que se encontram no nível do leito da vesícula biliar. Recebe a maior parte do seu sangue (mais ou menos 70%) da veia porta e uma porção menor através da artéria hepática. Pela veia porta chega ao fígado todo o material absorvido nos intestinos, com exceção da parte dos lipídios, que é transportada por via linfática. Graças a esta característica, o órgão está em posição privilegiada para metabolizar e acumular nutrientes e neutralizar e eliminar substâncias tóxicas absorvidas. Essa eliminação se dá pela bile, secreção exócrina da célula hepática. A bile desempenha também importante papel na digestão de lipídios (Junqueira e Carneiro, 1999; Rubin et al., 2010).

3.2.1 - Carcinoma Hepatocelular

O carcinoma hepatocelular ou hepatocarcinoma (CHC) é o câncer primário do fígado, ou seja, derivado das principais células do fígado, os hepatócitos. Como os demais cânceres, surge quando há mutação nos genes de uma célula que a faz se multiplicar desordenadamente. Essa mutação pode ser causada por agentes externos, como o vírus da hepatite, ou pelo excesso de multiplicações das células, como a regeneração nas hepatites crônicas, o que aumenta o risco de surgimento de erros na duplicação dos genes. CHC é o quinto tipo de câncer mais comum em homens e o sétimo em mulheres, diagnosticado todos os anos em mais de meio milhão de pessoas por todo o mundo (Gomes et al., 2013).

No Brasil, no município de São Paulo, segundo dados divulgados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), a incidência do câncer primário de fígado foi de 2,07/ 100.000

habitantes, considerada como incidência baixa. Apesar da grande maioria dos casos (85%) afetar principalmente países em desenvolvimento, sobretudo onde a infecção pelo vírus de hepatite B (HVB) é endêmica, a incidência em países desenvolvidos é cada vez maior. Esta patologia está associada a inúmeros fatores de risco não só ambientais, mas também genéticos e alimentares, os quais, cada vez mais, despertam interesse na procura pelo melhor conhecimento da patologia, muito associada ainda a diagnósticos tardios e maus prognósticos (Gomes et al., 2013, INCA, 2017). Entre os fatores alimentares de risco podemos ressaltar:

- Álcool - O efeito do álcool no desenvolvimento de CHC é conduzido pela inflamação hepática induzida por álcool com progressão para fibrose hepática ou cirrose;
- Aflatoxina B1 - Produto de fungos das espécies de *Aspergillus*, é um contaminante comum de grãos, nozes e vegetais em regiões onde clima e armazenamento favorecem seu desenvolvimento, sendo um carcinógeno direto induzindo mutações pontuais específicas em TP53;
- Ferro - A sobrecarga de ferro do fígado é um fator que contribui para a carcinogênese. Pode ocorrer em hemocromatose hereditária ou como sobrecarga de ferro secundária por causa da inflamação crônica, especialmente em pacientes com abuso de álcool (Schütte et al. 2016).

As estimativas da Sociedade Americana do Câncer, o hepatocarcinoma primário e câncer de ducto biliar intra-hepático nos Estados Unidos para 2017 são:

- Cerca de 40.710 novos casos (29.200 em homens e 11.510 em mulheres) serão diagnosticados;
- Cerca de 28.920 pessoas (19.610 homens e 9.310 mulheres) morrerão desses cânceres.

A incidência de câncer de fígado mais que triplicou desde 1980. No entanto, as taxas em adultos jovens recentemente começaram a diminuir. As taxas de mortalidade por câncer de fígado aumentaram quase 3% ao ano desde 2000 (American Cancer Society, 2017).

Mais de 700 mil pessoas são diagnosticadas com este tipo de câncer por ano em todo o mundo. O câncer de fígado é também uma das principais causas de morte, representando mais de 600 mil ocorrências por ano (American Cancer Society, 2017)

A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) é uma consequência de um quadro de obesidade mórbida. A doença do fígado gordo representa um espectro de

doenças decorrentes da deposição de gordura simples causando esteatose hepática à inflamação e fibrose não alcoólica até esteato-hepatite (NASH) com potencial de progressão para cirrose e consequentemente até câncer de fígado (Clanton e Subichin, 2016).

A obesidade provoca inflamação localizada dentro do microambiente do fígado, que pode predispor ao desenvolvimento de metástases. Além disso, a obesidade provoca inflamação sistêmica levando à liberação de fatores de crescimento tumorigênico (Pathak et al., 2016).

Na FIG. 2 podemos observar a progressão de uma doença hepática.

FIGURA 2 – Estágios dos danos hepáticos, desde o fígado normal até um estado cirrótico onde já não há nenhuma possibilidade de reversão do processo.

Fonte: Adaptada do My Sick liver, 2016 (Disponível em: <http://mysickliver.weebly.com/mdash-stages.html>)

3.3. Cultivo celular

O cultivo de células existe desde o início do século 20. Os estudos pioneiros de pesquisadores como Harrison, Carel e Roux, contribuíram para o desenvolvimento da técnica e para encorajamento de outros trabalhos relacionados ao cultivo de células.

Inicialmente esta técnica foi desenvolvida como um método para avaliar o comportamento celular fora do organismo em um meio ambiente controlado, e pode ser definida como um conjunto de práticas que permitem a manutenção de células em um sistema *in vitro* independente do tecido de origem sob condições controladas.

No início, os primeiros experimentos consistiam em cultivo de tecidos mecanicamente fragmentados em frascos que continham fluidos de animais de onde provinham os tecidos. Durante mais de 50 anos este procedimento foi denominado de cultivo de tecidos, atualmente este termo é utilizado genericamente para denominar tanto o cultivo de células quanto o cultivo de tecidos e órgãos. Desde então esta técnica se apresenta como uma importante e segura ferramenta de pesquisa em laboratórios do mundo todo (Alves e Guimarães. Fiocruz; Barbosa et al., 2015).

O cultivo de células apresenta inúmeras aplicações, desde a produção biotecnológica de moléculas recombinantes, anticorpos monoclonais, vacinas veterinárias e humanas, à produção de enxertos para transplantes. Muitos desses avanços só foram possíveis graças ao estabelecimento de linhagens celulares estáveis e a descoberta de sistemas de cultivo específicos para cada tipo celular (Alves e Guimarães. Fiocruz; Barbosa et al 2015).

3.3.1. Cultura Primária

Cultura primária refere-se a células isoladas oriundas de um fragmento de tecido e proliferam sob condições apropriadas até aderirem a parede da garrafa formando a primeira monocamada de células daquele tecido, isto é, atingir a confluência, nesta fase é quando deve ocorrer o subcultivo, transferindo para uma nova garrafa, com meio de cultura fresco que forneça as células todos os nutrientes, vitaminas, íons inorgânicos e matérias-primas necessárias, fornecendo assim mais espaço para o crescimento contínuo (Cell Culture Basics – Handbook, 2016).

3.3.2. Linhagens Celulares

Denomina-se linhagem celular uma população de células específicas originadas pelo subcultivo sequencial de uma população celular primária, na qual pode ser utilizada para estabelecer um banco, com conteúdo uniforme e estocado em um contêiner apropriado, sob condições definidas de armazenamento. As características de uma linhagem resultam de um conjunto de dados referentes ao crescimento populacional, citogenética, suscetibilidade celular a amostras virais, identificação da espécie e tecido de origem. (Barbosa et al., 2015).

3.4. Genotoxicidade

O termo genotoxicidade é um conceito mais amplo do que a mutagenicidade e descreve a capacidade dos compostos em afetar a estrutura do DNA ou o aparelho celular e Topoisomerases (desempenha importante papel nos processos de replicação e empacotamento de DNA), que são responsáveis pela fidelidade do genoma. Os efeitos genotóxicos no DNA nem sempre estão relacionados com mutações. (Eastmond et al., 2009, Slocznka et al., 2014).

3.4.1. Teste de Genotoxicidade – Teste do Micronúcleo

Descrito pela primeira vez por Schimidt W. em 1975 o teste do micronúcleo foi realizado em mamíferos através de teste *in vivo*. Ele tem a propriedade de detectar alterações cromossômicas durante a divisão celular, provocadas por substâncias mutagênicas (Flores e Yamaguchi, 2008).

O micronúcleo consiste numa porção citoplasmática de cromatina de forma redonda ou ovalada que se localiza perto do núcleo (FIG. 3).

FIGURA 3 – Micronúcleo formado.

Disponível em: <https://bioafgj.wordpress.com/projeto/>

A sua formação resulta de uma lise na molécula de DNA dias ou semanas após a ação de carcinógenos quando as células da camada basal estão em divisão. São constituídos de fragmentos de cromátide ou, cromossomos acêntricos ou aberrantes, que não foram incluídos no núcleo principal após a conclusão da mitose (FIG. 4) (Setúbal et al., 2005).

FIGURA 4 – Formação do micronúcleo por meio de perda anafásica e quebra cromossômica.

Disponível em: <https://bioafgj.wordpress.com/projeto/>

É importante ressaltar que os micronúcleos analisados são de células em interfase, obtidas de cultura celular expostas ou não à citocalasina B. Essa substância apresenta como mecanismo de ação ligar-se à actina dos microfilamentos presentes no citoesqueleto, inibindo desta forma sua polimerização durante a formação do anel contrátil, consequentemente levando o bloqueio da citocinese, realizando então uma única célula com o conteúdo citoplasmático das duas células-filhas. Em condições normais, a clivagem das células ocorre devido à polimerização e despolimerização dos microfilamentos dando origem as células filhas (Lin et al., 1978; Parry e Sors, 1993; Fenech, 2007; Esteves-Pedro, 2013).

O guia da OECD 487 (2016) autoriza a utilização de protocolos para o ensaio com e sem a presença da citocalasina B desde que a linhagem celular utilizada tenha passado pelo processo de mitose, durante ou depois da exposição à substância teste. É importante destacar que em ambos os protocolos, a proliferação celular ocorreu nas culturas que não receberam nenhum tratamento (controle de células) e também nas culturas que receberam tratamento com a substância teste. Neste ensaio também é possível avaliar a extensão da citotoxicidade baseados no aumento do número de micronúcleos das células, como nos controles positivos (Kirsch-Volders; et al., 2000; Esteves-Pedro, 2013; OECD 487, 2016).

Destacam-se dentre os controles positivos agentes clastogênicos e aneugênicos, como por exemplo a radiação ionizante por ^{60}Co e substâncias químicas preconizadas pelo OECD 487 (2016) como a colchicina, mitomicina C e o benzo[A]pireno. Exemplificando um agente aneugênico temos o alcaloide colchicina, seu mecanismo de ação consiste em alterar o número de cromossomos, pois impede a formação dos polos do fuso durante a metáfase da mitose. Um agente clastogênico responsável pela alquilação do DNA é o alquilante mitomicina C, que durante a interfase atua na inibição seletiva da síntese de DNA, recombinação e troca de cromátides irmãs. O benzo[A]pireno é um alquilante, agente clastogênico responsável pela alquilação do DNA o que resulta em metabólitos reativos, redução da proliferação celular nas fases S e G2 da interfase e o aumento da expressão do gene p53 em células tumorais (Carrano et al., 1979; Parry e Sors, 1993; Casanova et al., 1996; Sadikovic e Rodenhiser, 2006; Esteves-Pedro, 2013).

É de grande importância salientar que no teste preconizado pelo guia da OECD 487 *In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*, a contagem das células bem como dos micronúcleos é realizada por meio de análise de lâminas. Contudo, a busca pela automação do ensaio do MN é crescente em diversos grupos de pesquisas, principalmente na fase que se diz respeito a contagem de células. A utilização da citometria de fluxo tem se apresentado

como um facilitador durante a contagem de células e dos micronúcleos, devido à rapidez das análises comparando-se ao método tradicional de leitura das lâminas com auxílio de um microscópio óptico (Esteves-Pedro, 2013).

O citômetro de fluxo é um equipamento que identifica múltiplas características físicas tais como: tamanho, granulosidade e a intensidade de fluorescência em partículas individuais, e seu princípio consiste na detecção da fluorescência de partículas marcadas com anticorpos que se ligam a superfície celular, intracelular ou nuclear. O mecanismo de ação desses marcadores tem como objetivo absorver a luz em determinado comprimento de onda (λ) e emitir em outro λ (Hawley e Hawley, 2004).

Através de um sistema de fluxo de fluidos as partículas são transportadas e individualmente passam por um feixe de laser, que converte esse evento em sinal digital captado e analisado por um programa de computador.

Dentre os principais componentes de um citômetro estão: recipientes para amostra e sistemas de fluidos, sistema óptico composto por laser e filtros ópticos, sistemas de detectores para captação dos sinais de acordo com a sua cor e sistema eletrônico computacional que converte os sinais luminosos detectados em sinais eletrônicos (FIG. 5) (Hawley e Hawley, 2004; Invitrogen, 2013).

FIGURA 5 – Componentes essenciais de um citômetro de fluxo e a identificação referente ao tamanho (*Forward Scatter FSC*) e granulosidade (*Side Scatter SSC*).

Fonte: Esteves-Pedro 2013.

A capacidade de análise simultânea de múltiplos parâmetros celulares corresponde a uma das várias vantagens da citometria de fluxo. Na década de 70 era somente utilizado para análises em células sanguíneas, hoje a técnica analisa bactérias, vírus, inúmeras linhagens celulares eucariontes aderentes ou não, cromossomos, núcleos e os micronúcleos, sendo possível desta forma uma importante automatização do teste MN (Hawley e Hawley, 2004; Scheffold e Kern, 2000).

No ensaio do MN utilizando citometria de fluxo, Collins et al. (2008) e Avlasevich et al. (2011) utilizaram um kit comercial *Litron in vitro Microflow®* kit, que utiliza agentes fluorescentes EMA (ethidium monoazide) e SYTOX® Green. A coloração sequencial desses agentes resulta na diferenciação dos micronúcleos e da cromatina de células em apoptose e necrose, este efeito ocorre através dos mecanismos de ação dos corantes: EMA que atravessa a membrana comprometida de células apoptóticas e necróticas

e se liga covalentemente ao DNA; e o SYTOX® Green que marca a cromatina de células viáveis (Esteves-Pedro, 2013).

Baseando-se neste mesmo princípio, os autores Bryce et al. (2007) também realizaram o ensaio do MN utilizando esta técnica, porém não fizeram o uso deste kit comercial, desenvolveram uma metodologia inspirados também na incorporação desses agentes fluorescentes (Esteves-Pedro, 2013).

Uma importante vantagem da utilização deste método como marcador intermediário é a sua habilidade de mensurar de forma apurada e objetiva a frequência de defeitos no DNA. Além disso, o micronúcleo aparece após o dano, antes mesmo de qualquer alteração pré-maligna clínica ou até mesmo histológica (Setúbal et al., 2005), ou seja, detecta danos irreversíveis o que não ocorre no teste do cometa.

Após a remoção dos carcinógenos, nota-se que há uma redução de micronúcleos rapidamente. Estas evidências são confirmadas pela redução destes defeitos cromossômicos observados após o tratamento de neoplasias malignas com radioterapia, quando comparados a contagem dos que não foram irradiados (Setúbal et al., 2005) ou até mesmo em testes *in vitro* quando o composto em questão é retirado dos testes ou quando é comparado ao controle quando as linhagens avaliadas não recebem nenhum tratamento.

Poucos são os estudos que constam na literatura referentes aos testes utilizados para avaliação da genotoxicidade das 2-ACBs utilizando as técnicas dos testes do Cometa e micronúcleo. O teste do cometa é apenas um dos muitos testes toxicológicos, apesar dele mostrar alta sensibilidade para carcinógenos, sua especificidade é incerta, porque a base de dados ainda está insuficiente (Anderson et al., 1998). Na TAB. 1 constam os trabalhos realizados com estas técnicas.

TABELA 1 – Trabalhos realizados para identificar danos genotóxicos das 2-ACBs utilizando os ensaios de cometa e micronúcleo

Autor/Ano	Ensaio	2-Alcliciclobutanona	Doses Usadas	Linhagem	Resultados
<i>Delincée et al. (1998)</i>	Cometa	2-DCB	0.25 - 0.50 - 0.75 - 1.00 - 1.12 mg/mL	Celulas Humanas de cólon	Positivo
<i>Delincée et al. (2002)</i>	Cometa	2-TCB	25 - 50 - 100 - 200 - 400 µM	HT29 - HT29 clone 19A	Negativo
<i>Nknoll et al. (2006)</i>	Cometa	2-dDCB	150 - 200 - 250 - 300 µM	LT97 - HT29 clone 19A	Positivo em LT97 Negativo em HT29 clone 19A
<i>Hartwig et al. (2007)</i>	Cometa	2-DCB; 2-dDCB; 2-tDCB; 2-tDeCB	25 - 50 - 100 - 200 - 400	HT29 clone 19A	Negativo em 30 min Positivo após 24 hs
<i>Yamakage et al. (2014)</i>	Cometa	2-dDCB 2-tDCB	0.044 - 0.066 mg/mL 0.13 - 0.44 - 0.67 mg/mL	CHL/IU	Negativo
<i>Yamakage et al. (2014)</i>	Micronúcleo	2-dDCB 2-tDCB	500 - 1000 - 2000 mg/Kg/dia	Medula Óssea	Negativo

Fonte: Da autora

3.5. Viabilidade Celular

O teste de citotoxicidade é um dos testes de avaliação da viabilidade celular através de rastreios biológicos que utilizam células de tecido *in vitro* para observar o crescimento celular, reprodução e efeitos morfológicos quando estas são expostas à diversos compostos. A citotoxicidade é o teste de primeira escolha como um indicador importante para a avaliação da toxicidade, uma vez que é simples, rápido e tem uma elevada sensibilidade (Li et al., 2015).

3.5.1. Métodos utilizados para identificar a viabilidade celular

Uma variedade de compostos de tetrazólio tem sido utilizada para detectar células viáveis, dentre eles os mais frequentemente utilizados são: MTT, MTS, XTT e WST-1.

Estes testes se dividem em duas categorias: MTT, que é carregado positivamente e penetra prontamente em células eucarióticas viáveis e MTS, XTT, WST-1, os quais são carregados negativamente, o que dificulta sua penetração no interior das células. São

tipicamente utilizados com um aceptor intermediário de elétrons que pode transferir elétrons da membrana plasmática ou citoplasma para facilitar a redução do tetrazólio a formazan que é clivado somente em mitocôndrias ativas, desta forma ocorrendo somente em células viáveis, após o período de incubação as análises são realizadas por determinação prática quantitativa através de um espectrofotômetro (leitor de microplacas) (Mosmann, 1983; Delinceé et al., 2002; Riss et al., 2016).

Outro método bastante utilizado, o Azul de tripano, é um ensaio basicamente simples onde as células mortas são coradas pois suas membranas estão danificadas, ocorrendo desta forma o fluxo de corante para o interior da célula, fornecendo uma coloração azul. Neste método, a viabilidade das células deve ser determinada por contagem, células coradas das não coradas com auxílio de um microscópio (Measuring Cell Viability-Cytotoxicity, 2016; Alves e Guimarães, 2016).

3.5.2. Viabilidade Celular e 2-ACBs

Diversos autores já abordaram o efeito citotóxico das 2-ACBs em células de cólon utilizando várias técnicas diferentes que avaliam a viabilidade celular, onde observaram seus efeitos variando o tipo do composto, concentrações e tempo de incubação. Na TAB. 2 podemos observar todos os trabalhos que já foram realizados para verificar possíveis danos de citotoxicidade quando as células eram expostas aos compostos 2-ACBs.

TABELA 2 – Trabalhos realizados para avaliação do potencial citotóxico das 2-ACBs disponíveis na literatura a partir do ano de 1998 até 2017

Autor/ Ano	Composto	Teste	Linhagem Celular	Concentração	Período / % Viabilidade					
					30 min	60 min	90 min	120 min	24h	48h
<i>Delincée et al / 1998</i>	2-DCB	Azul de Tripan	Células de Rato	0,25 mg/ml	85%					
				0,50 mg/ml	65%					
				0,75 mg/ml	60%					
				1,00 mg/ml	57%					
				1,25 mg/ml	55%					
		Azul de Tripan	Células Humana	0,25 mg/ml	55%					
				0,50 mg/ml	48%					
				0,75 mg/ml	45%					
				1,00 mg/ml	40%					
				1,25 mg/ml	35%					
<i>Delincée et al / 2002</i>	2-tDCB	MTT	HT29	100 µmol	90%				80%	60%
				200 µmol	N/O				45%	17%
				400 µmol	N/O				5%	0%
	2-tDeCB	MTT	HT29	100 µmol	90%				15%	10%
				200 µmol	90%				10%	0%
				400 µmol	85%				0%	0%
	2-tDeCB cis- pure	MTT	HT29	100 µmol	<=100%				65%	25%
				200 µmol	<=100%				15%	0%
				400 µmol	100%				5%	0%
	2-dDCB	MTT	HT29	100 µmol	<=100%				70%	20%
				200 µmol	<=100%				5%	0%
				400 µmol	100%				0%	0%
	2-tDeCB trans- pure	MTT	HT29	100 µmol	95%				65%	40%
				200 µmol	95%				15%	5%
				400 µmol	95%				5%	0%
	2-tDCB	MTT	HT29 clone 19A	100 µmol	<=100%				75%	50%
				200 µmol	<=100%				45%	15%
				400 µmol	<=100%				10%	5%
	2-tDeCB	MTT	HT29 clone 19A	100 µmol	<=100%				75%	57%
				200 µmol	<=100%				30%	5%
				400 µmol	90%				10%	5%
	2-tDeCB cis- pure	MTT	HT29 clone 19A	100 µmol	<=100%				55%	55%
				200 µmol	<=100%				30%	5%
				400 µmol	85%				5%	0%
	2-dDCB	MTT	HT29 clone 19A	100 µmol	<=100%				65%	30%
				200 µmol	100%				25%	0%
				400 µmol	95%				0%	0%
	2-tDeCB trans- pure	MTT	HT29 clone 19A	100 µmol	<=100%				55%	40%
				200 µmol	<=100%				25%	5%
				400 µmol	<=100%				23%	0%
	2-tDCB	WST	HT29	100 µmol	<=100%				100%	<=100%
				200 µmol	<=100%				100%	<=100%
				400 µmol	<=100%				25%	0%
	2-tDeCB	WST	HT29	100 µmol	95%				<=100%	<=100%
				200 µmol	90%				75%	15%
				400 µmol	95%				20%	0%
	2-tDeCB cis- pure	WST	HT29	100 µmol	<=100%				<=100%	100%
				200 µmol	<=100%				<=100%	35%
				400 µmol	<=100%				50%	5%
	2-dDCB	WST	HT29	100 µmol	100%				100%	<=100%
				200 µmol	<=100%				95%	<=100%
				400 µmol	<=100%				25%	0%
	2-tDeCB trans- pure	WST	HT29	100 µmol	<=100%				<=100%	<=100%
				200 µmol	<=100%				95%	95%
				400 µmol	<=100%				45%	0%

Autor/ Ano	Composto	Teste	Linhagem Celular	Concentração	Período / % Viabilidade					
					30 min	60 min	90 min	120 min	24h	48h
<i>Delincée et al / 2002</i>	2-tDCB	WST	HT29 clone 19A	100 µmol	98%				<=100%	<=100%
				200 µmol	100%				<=100%	<=100%
				400 µmol	<=100%				<=100%	80%
	2-tDeCB	WST	HT29 clone 19A	100 µmol	<=100%				100%	<=100%
				200 µmol	<=100%				<=100%	<=100%
				400 µmol	<=100%				85%	0%
	2-tDeCB cis- pure	WST	HT29 clone 19A	100 µmol	95%				<=100%	<=100%
				200 µmol	<=100%				<=100%	<=100%
				400 µmol	<=100%				<=100%	5%
	2-dDCB	WST	HT29 clone 19A	100 µmol	100%				90%	<=100%
				200 µmol	<=100%				<=100%	<=100%
				400 µmol	<=100%				<=100%	0%
	2-tDeCB trans- pure	WST	HT29 clone 19A	100 µmol	80%				<=100%	<=100%
				200 µmol	90%				<=100%	<=100%
				400 µmol	98%				<=100%	45%
<i>Delincée et al / 2002</i>	2-TCB	MTT	HT29	100 µmol	<=100%				80%	60%
				200 µmol	<=100%				40%	20%
				400 µmol	<=100%				10%	0%
		MTT	HT29 clone 19A	100 µmol	<=100%				78%	50%
				200 µmol	<=100%				45%	18%
				400 µmol	<=100%				10%	3%
<i>Knoll et al / 2006</i>	2-dDCB	Azul de Tripan	HT29 clone 19A	150 µmol	94%	89%	92%	82%		
				300 µmol	94%	88%	89%	88%		
				600 µmol	90%	87%	87%	85%		
				1049 µmol	91%	88%	78%	85%		
				2097 µmol	88%	88%	79%	80%		
	2-dDCB	Azul de Tripan	LT 97	150 µmol	89%	74%	62%	19%		
				300 µmol	87%	72%	38%	10%		
				600 µmol	82%	69%	44%	24%		
				1049 µmol	80%	66%	34%	17%		
				2097 µmol	85%	64%	34%	8%		
	2-dDCB	Azul de Tripan	Humana Primária de Cólon	150 µmol	77%	65%	34%	18%		
				300 µmol	67%	52%	27%	11%		
				600 µmol	70%	48%	19%	11%		
				1049 µmol	59%	45%	25%	9%		
				2097 µmol	67%	43%	14%	8%		
<i>Hartwig et al / 2007</i>	2-dDCB	Azul de Tripan	HT29 clone 19A	100 µmol	<=100%				65%	35%
				200 µmol	<=100%				30%	0%
				300 µmol	<=100%				18%	0%
				400 µmol	<=100%				0%	0%

Fonte: Da autora

3.6. Mutagenicidade

Os genomas de todos os organismos vivos são constantemente submetidos a danos por agentes externos e processos endógenos, tais como danos espontâneos ao DNA.

A mutagenicidade refere-se à indução de alterações permanentes na sequência de DNA de um organismo, o que pode resultar em uma mudança hereditária característica dos organismos vivos. As mutações podem alterar um único gene, um bloco de genes, ou cromossomos inteiros. Mutações de ponto são mutações que afetam apenas um nucleotídeo ou alguns nucleotídeos dentro de um gene. As mutações pontuais são as que ocorrem alterações no DNA e podem ser divididas em três tipos principais:

- Substituição de pares de bases (substituição de um par de bases com outro);
- Supressão (perda de um ou mais pares de bases);
- Inserção (adição de pares de bases extras na sequência de DNA) (Slocznka et al., 2014).

As mutações são criadas principalmente por fatores externos, químicos e físicos, chamados mutagênicos. Além disso, podem ocorrer espontaneamente devido a erros no DNA (replicação, reparação e recombinação). Em geral, mutações podem ser agrupadas em negativa, neutra, positiva, letal e subletal.

Mutações somáticas podem contribuir para a patogênese de várias condições patológicas, incluindo o câncer (Weakley et al., 2010, Slocznka et al., 2014).

3.6.1. Avaliação da Mutagenicidade – Teste de Ames

Ensaio de mutação bacteriana reversa ou teste de Ames é amplamente empregado em estudos de toxicologia genética de diversos produtos (químicos, farmacêuticos, alimentícios, biológicos e físicos), e são bem aceitos pelas agências governamentais de regulamentação, (incluindo OECD 471 e ANVISA) e pelas comunidades científicas nacionais e internacionais.

O ensaio também pode ser utilizado para estudos de monitoramento ambiental (animais expostos a contaminação ambiental) ou populacional (pessoas expostas a contaminantes ou radiações ionizantes e seus subprodutos).

O teste foi desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames e colaboradores na década de 70 e revisado por Maron & Ames, 1983. É um teste realizado *in vitro* de curta duração para

avaliar possíveis efeitos mutagênicos provocados por substâncias químicas (Tagliari et al., 1999). Basicamente, o ensaio consiste na exposição de células bacterianas em suspensão a substâncias-teste. Foram utilizadas linhagens bacterianas mutantes de *S. typhimurium* (*Salmonella typhimurium*) ou *E. coli* (*Escherichia coli*) dependentes de aminoácidos, e quando ocorre ausência de uma fonte externa desses aminoácidos, essas bactérias não conseguem formar colônias.

Na ocorrência de reversão da mutação que as torna dependentes de aminoácidos, as células recuperam a habilidade de crescer em meio de cultura mínimo. Reversões espontâneas ocorrem naturalmente com essas linhagens. A taxa de reversão basal tende a ser aumentada por compostos mutagênicos, gerando um acréscimo no número de colônias resultantes. Após o seu metabolismo no fígado, muitos químicos carcinogênicos tornam-se biologicamente ativos. Diferentemente dos vertebrados as bactérias não apresentam sistemas de metabolização. Dessa forma, para a detecção de substâncias ativadas após sua metabolização, a utilização de um sistema de ativação metabólico exógeno (enzimas de fígado de roedor) se faz necessária (Mortelmans e Zeiger, 2000).

Em 1973 Ames desenvolveu o procedimento de ensaio de incorporação em placas, que é mais sensível e quantitativo do que o ensaio *spot test* (refere-se a testes sensíveis e seletivos baseado em reações químicas). O procedimento sem ativação metabólica consiste na adição da substância teste, tampão fosfato estéril (PBS), e as linhagens bacterianas em 2 mL de top ágar contendo histidina e biotina. Para o teste com ativação metabólica ocorre a substituição do tampão fosfato estéril pelo sistema de ativação metabólica S9 Mix. A mistura é cuidadosamente homogeneizada e vertida sobre a placa contendo ágar mínimo. Quando o ágar se solidificar, as placas serão incubadas a 37 ° C durante 4 horas (OECD, 2007; Tejs, 2008).

Tem sido desenvolvido por diversos fabricantes e instituições de pesquisa, novas metodologias baseadas em métodos colorimétricos utilizando microplacas. Um exemplo é o ensaio de mutagenicidade desenvolvido pela Xenometrix®, que consiste em expor as linhagens bacterianas à substância-teste por 90 minutos, em um meio com pequena quantidade de histidina. Em seguida as culturas são diluídas em um meio sem histidina e com indicador de pH, e distribuídas em uma placa de 384 cavidades. Após 48 horas de incubação é realizada a leitura e comparada com os controles positivo e negativo. Caso a substância seja mutagênica, as bactérias terão sua mutação revertida e crescerão em maior quantidade, ocasionando desta forma a diminuição do pH do meio e alteração de sua cor. O ensaio pode ser realizado com ou sem sistema de ativação metabólica. Diferentemente dos

métodos já existentes, esse método utiliza somente as linhagens TA-98, TA-100, TA-1535 e TA- 1537 de *S. typhimurium* (Xenometrix, 2008). Portanto, pode-se dizer que esse kit detecta uma gama menor de mutações que os outros métodos, pois não utiliza nenhuma linhagem que detecta mutações em sítios com presença de timidina (-T-A-A-) (TA-102, TA-104 e WP2 *uvrA*). Este teste e sua metodologia ainda carecem de validação e uma maior aceitação por parte das autoridades de saúde (Bispo, 2014).

Com o passar dos anos, testes para determinar a reprodutibilidade dos resultados desses ensaios a nível inter e intralaboratorial foram realizados. A determinação da sensibilidade do teste de Ames em relação a estudos de carcinogenicidade animal também foram feitos para validação das metodologias. Através desses estudos, pôde-se constatar que existe um alto poder preditivo para resultados positivos no teste de Ames quando comparado ao estudo com animais (Mortelmans e Zeiger, 2000). O teste de Ames apresenta boa reprodutibilidade e não apresenta sérias falhas quando utilizado para a maioria das classes químicas, ele foi capaz de detectar cerca de 90 % dos carcinógenos humanos conhecidos (Kirkland et al., 2005).

Portanto, tem sido selecionado como o método de primeira escolha para uma avaliação preliminar de mutagenicidade e carcinogenicidade. É considerado o melhor ensaio autônomo para identificação de genotoxicidade, sendo amplamente utilizado em diversos segmentos (Mahadean, 2011).

3.6.2. Estudos realizados de mutagenicidade das 2-ACB utilizando o teste de Ames

Na TAB. 3, podemos observar os estudos de mutagenicidade já realizados bem como as informações contidas nos experimentos, autores e ano de realização. Pequenas alterações como por exemplo solvente utilizado, como grandes diferenças no que diz respeito a dosagem do composto e linhagens utilizadas foram notadas. Todas essas análises são importantes fatores pois unem todas as informações proporcionando uma análise da confiabilidade do teste e dos resultados aqui expostos e podendo ainda ser útil para pesquisas futuras sobre o tema.

TABELA 3 – Trabalhos realizados para avaliação da mutagenicidade das 2-ACBs utilizando o Teste de Ames disponíveis na literatura a partir do ano de 2002 até 2017

Autor/Ano	2-Alcliciclobutanona	Doses Utilizadas	Linhagens	Solvente	Resultados
<i>Burnouf et al . (2002)</i>	2-DCB	0.4 µM - 1 µM - 2 µM - 4 µM - 40 µM/placa	TA 97, TA 98 and TA 100.	Etanol	Negativo
	2-dDCB	4 µM - 40 µM/placa			
	2-tDCB	4 µM - 40 µM/placa			
<i>Sommers 2003</i>	2-DCB	0.05 mg - 0.10 mg - 0.50 mg/poço	WP2 (pKM101), WP2 <i>uvra</i> (pKM101)	DMSO	Negativo
<i>Sommers e Schiestl (2004)</i>	2-DCB	0.05 mg - 0.10 mg - 0.50 mg - 1.0 mg/poço	TA98, TA100, TA1535, TA1537	DMSO	Negativo
<i>Gadgil e Smith (2004)</i>	2-DCB	0.25 µM - 0.5 µM - 0.75 µM - 0.1 µM	TA97, TA98, TA100, TA102, TA1535	DMSO	Negativo
<i>Hartwig et al (2007)</i>	2-DCB	0.4 µM - 1 µM - 2 µM - 4 µM/placa	TA97, TA98, TA100	Etanol	Negativo
	2-dDCB	4 µM - 40 µM/placa			
	2-tDCB	40 µM - 400 µM/placa			
<i>Yamakage et al (2014)</i>	2-dDCB	19.5 µg, 39.1 µg, 78.1 µg, 156 µg, 313 µg, 625 µg, 1250 µg, 2500 µg, 5000 µg/placa	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 <i>uvra</i>	Etanol	Negativo
	2-tDCB	78.1 µg, 156 µg, 313 µg, 625 µg, 1250 µg, 2500 µg, 5000 µg/placa			

Etanol 2% (Concentração final)

DMSO: Sulfóxido de dimetilo

Fonte: Da autora

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Substância Teste - Compostos 2-ACBs e Soluções

➤ 2-ACBS

A pureza química da 2-dDCB é de 99,2% e 2-tDCB é de 99,1% ambas foram sintetizadas por Fluka Analytical adquiridas através da Sigma – Aldrich (EUA), CAS 35493-46-0 e CAS 35493-47-1. Na FIG. 6 embalagens da 2-tDCB e 2-dDCB sintéticas apresentadas no mercado.

FIGURA 6 – Embalagens comerciais das 2-ACBs apresentadas no mercado. 2-tDCB possui formato sólido (pó) e tem sensibilidade a luz, peso molecular 266,46 g/mol e 2-dDCB também possui forma sólida, geralmente vem aderida ao frasco, peso molecular 238,41 g/mol.

Fonte: Da autora, arquivo pessoal

O composto 2-tDCB foi ressuspensão em 190 µL e o 2-dDCB foi ressuspensão em 210 µL de etanol puro para 0,1M.

Para realizar as diluições necessárias, tomamos por base a seguinte fórmula:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Onde:

C_1 – Concentração 1

V_1 – Volume 1

C_2 – Concentração 2

V_2 – Volume 2

Após a solubilização dos compostos em etanol, a solução estoque na concentração de 500 µM foi preparada. Como por exemplo: o preparo de 8500 µL de solução.

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$100\text{mM} \times X = 0,5\text{mM} \times 8500 \mu\text{L}$$

$$X = \frac{4250}{100}$$

$$100$$

$$X = 42,5 \mu\text{L (composto)}$$

Para completar o volume total de solução, este composto foi adicionado a 8457,5 µL de DMEM, onde se obteve uma concentração final de etanol a 2% (v/v). A partir desta solução, foram preparadas as duas outras concentrações teste (100 e 300 µM).

4.1.1.1. Soluções utilizadas para o cultivo de células nos testes de micronúcleo e viabilidade celular

- Meio de Cultura

Em uma proveta de 250 mL foi adicionado 248 mL de água MilliQ, 0,3 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e 3,9 g de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). A solução foi mantida em agitação até que houvesse a completa dissolução. O pH foi verificado, geralmente 7. Após este procedimento, no fluxo laminar o conteúdo passou pelo processo de filtração em membrana de 0,22 μm a fim de esterilização. Em seguida o conteúdo foi dividido em frascos, de cada frasco uma amostra de 5 mL foi retirada e adicionada em um frasco de cintilação e mantido na estufa a 37°C e 5% CO_2 , por 48 horas para verificar a ausência de contaminação, já os frascos contendo o meio foram acondicionados na geladeira.

- Meio de Cultivo

SFB (Soro Fetal Bovino – Cultilab, São Paulo/ Brasil) age como importante papel no fator de crescimento das células, uma vez que os meios de cultivo são isentos de quaisquer substâncias mutagênicas. Por esta razão, previamente à sua utilização na cultura das células, foi adicionado SFB nas garrafas contendo o meio de cultura preparado, numa proporção de 10% do volume total.

- PBS

Em um balão volumétrico contendo 1000 mL de água deionizada (q.s.p) foram dissolvidos 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 0,2 g de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4), 0,8 g de cloreto de sódio (NaCl) e 1,15 g de fosfato de sódio anidro (NaHPO_4), posteriormente permaneceram em agitação até sua completa solubilização. Quando necessário o pH foi ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico a 0,1 M, e a esterilização foi realizada por autoclavagem à 120°C por 30 minutos.

- Tripsina

Utilizada para o desprendimento das células da parede da garrafa, a tripsina, é uma enzima proteolítica que através da degradação da matriz glicoproteica desempenha esta função. Foi preparada em um frasco de 100 mL contendo 90 mL de PBS (ambos previamente

esterilizados) e 10 mL de solução tripsina (0,2%) + EDTA (0,02%), homogeneizou-se bem e na sequência foi armazenado na geladeira.

4.1.2. Linhagens Celulares

Utilizamos células provenientes de linhagens hepáticas do BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro). HepG2 (Hepatoma Humano), BRL3A (Célula hepática normal) e HTC (Hepatoma de rato), disponíveis no ICB/USP (Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo) do setor de Biologia Celular e Tecidual e do desenvolvimento, para utilização nos testes de micronúcleo e de viabilidade celular.

A HepG2, é uma linhagem de hepatoma humano altamente favorável para a nossa análise, dada a possibilidade de cultivo em grande escala. Em seres humanos, o fígado é um órgão que pode acumular grande quantidade de gordura, o que também viabiliza o possível acúmulo das 2 ACBs; e por se tratar de uma célula tumoral, analisar os efeitos na proliferação celular, torna-se relevante para esta análise (Donato, et al., 2015).

A BRL 3A é uma linhagem celular epitelial do fígado de rato normal, que é capaz de se dividir na ausência de soro, embora o cultivo tenha sido realizado igualmente para as três linhagens (Boess et al., 2003), pois já havia sido adaptada para crescer com soro.

A linhagem HTC foi selecionada para este estudo pois se trata de uma linhagem derivada de um tumor hepático de ratos machos, que por sua vez foi derivado de um hepatoma sólido induzido nos animais (Public Health England, 2017).

Na FIG. 7 podemos observar a morfologia das células cultivadas.

FIGURA 7 – Morfologia das linhagens (a) HTC, (b) BRL3A e (c) HepG2. Utilizada lente objetiva de 20X.

Fonte: Da autora - arquivo pessoal

4.1.3. Soluções utilizadas no Ensaio de Micronúcleos

➤ Controle Positivo

2.397,6 mL Meio de cultura + 2,4 µL de Mitomicina (Mitomycin, Sigma Aldrich CAS 50-07-7)

2.397,6 mL Meio de cultura + 2,4 µL de Colchicina (Colchicine, Sigma Aldrich CAS 64-86-8)

➤ Controle Negativo

2.397,6 mL Meio de cultura + 2,4 µL NaCL.

1.920 mL Meio de cultura + 480 µL DMSO.

➤ Solução I

14.700 mL PBS

300 µl SFB

(Filtrar com filtro de seringa 0,22 µm)

➤ Lise I Incompleta

58,4 mg de NaCl

100 mg de Citrato de Sódio

30 µL Igepal

➤ Lise I Completa

10.551,2 µL de Lise I incompleta

50 µL RNase (Ribonuclease 3'-pyrimidinoligonucleotidohydrolase, Sigma Aldrich, Ref. CAS 9001-99-4)

0,768 µL de Sytox Green (SYTOX® Green nucleic acid stain, Life Technologies, Ref. S7020)

➤ Lise II Incompleta

8.560 mg de sacarose

1.500 mg de Ácido cítrico

100 ml de água MilliQ

➤ Lise II Completa

10.119,2 µL de Lise II incompleta

480 µL de Beads (AccuCheck Counting Beads for count & pipetting accuracy Life Technologies Ref. PCB 100)

0,768 µL de Sytox Green.

4.1.4. Soluções utilizadas no Teste de Ames

- Caldo nutriente e placas de ágar mínimo

Para o crescimento dos inóculos foi utilizado caldo nutriente, que foi preparado com: 25 g de Caldo Nutritivo Oxoid N° 2 e 1000 mL de água destilada.

- Ágar Glicose

15 g de Bacto-ágar, 20 g de glicose e 900 mL de água destilada.

- Solução de Vogel-Bonner E (10X)

0,2 g de sulfato de magnésio hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$); 20 g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ p.a); 100 g de fosfato de potássio dibásico (K_2PO_4); 3 5 g de fosfato de sódio e amônio tetrahidratado ($\text{Na}_2\text{NH}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e água destilada suficiente para 1 Litro.

Para ensaio de mutagenicidade em bactéria foi utilizado ágar mínimo como base nas placas com meio seletivo. Esse meio foi preparado com: 10 % de solução de Vogel-Bonner E (10X) e 90 % de Ágar Glicose. Esses dois componentes foram previamente preparados e autoclavados separadamente para posterior fusão.

Foi adicionado aproximadamente 25 mL de ágar mínimo por placa de petri descartável, esterilizada por radiação gama, com 9 cm de diâmetro. Foi observado em testes anteriores realizados no CDTN (Centro do Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear) que placas esterilizadas por óxido de etileno aumentam a taxa de reversão basal das linhagens TA-100 e TA-1535 (Bispo, 2014).

- Top agar ou Ágar de superfície

O top agar contém biotina e traços de histidina. No caso da *E. coli*, o top agar contém traços de triptofano. Os aminoácidos-traço permitem que as bactérias dependentes de histidina e triptofano consigam realizar de seis a oito divisões antes de esgotar o estoque desses nutrientes. Esse limitado número de divisões aumenta a sensibilidade das células bacterianas a substâncias mutagênicas e permite a fixação das lesões ao DNA. Esse meio foi preparado com: 6 g de Bacto-ágar; 5 g de NaCl e água destilada suficiente para 1 Litro. Em seguida foi suplementado com 0,05 mM de histidina e 0,05 mM de biotina para linhagens de *S. typhimurium*. Para as linhagens de *E. coli*, suplementa-se com triptofano 0,05 mM.

- Fração S9 – Homogeneizado de fígado de rato e preparo da solução S9-mix

O homogeneizado liofilizado de fígado de rato (fração S9), induzido com Aroclor 1254, foi adquirido junto à Moltox Molecular Toxicology, Inc, Boone, NC 28607, USA. No dia do experimento, instantes antes de sua utilização, a solução de Ativação Metabólica S9-mix (10 % - v/v) foi preparada mantida em gelo durante todo o processo.

- Preparo do inóculo

Culturas que permaneciam em estoque foram descongeladas, a linhagem bacteriana em estudo foi ressuspensa em caldo nutriente (Oxoid Nutrient Broth #2) em seguida o inóculo preparado foi levado a um agitador (shaker) regulado para 37 °C e aproximadamente 100 RPM. O crescimento do inóculo foi monitorado por espectrofotometria, e a D.O._{660nm} ideal está entre 1,2 e 1,4, correspondente de 1 a 2×10^9 UFC/mL, e o tempo para atingir este crescimento variou de 3 a 6 horas. Apenas culturas preparadas no dia do teste foram utilizadas nos ensaios de mutagenicidade.

- Linhagens em cultura estoque

As linhagens bacterianas foram congeladas e mantidas em nitrogênio líquido (-196 °C). O DMSO (ou glicerol) foi adicionado ao caldo nutriente, com a finalidade de atingir uma concentração final de 10 % (v/v), atuando como crioprotetor.

4.2. Métodos

4.2.1. Ensaio do Micronúcleo

Os ensaios foram realizados em sua parte inicial no ICB/USP no setor de Biologia Celular e Tecidual e do Desenvolvimento, e em sua parte final no CB/IPEN (Centro de Biotecnologia / Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) utilizando-se o protocolo de Bemis et al. (2016) e Bryce et al. (2007) com algumas modificações.

4.2.1.1. Solubilização dos compostos testes

As 2-ACBs foram solubilizadas de acordo com o tópico 4.1.1. Substância Teste - Compostos 2-ACBs e Soluções deste trabalho.

4.2.1.2. Linhagens utilizadas no ensaio

Conforme descrito no tópico 4.1.2. Linhagens Celulares, as células utilizadas no ensaio do MN foram : BRL 3A, HepG2, e HTC.

4.2.1.2.1. Protocolo de cultivo e manutenção das culturas das células HepG2, BRL3A e HTC

- Descongelamento das células

Após retirar os tubos criogênicos contendo as células do nitrogênio líquido, as células foram descongeladas e transferidas para garrafas próprias de cultivo celular contendo meio de cultura suplementado com 10 % de SFB. Após este procedimento as garrafas foram acondicionadas na estufa sob atmosfera de 5 % de CO₂ à 37°C. Após um período de 24 horas os meios de cultura dessas garrafas foram retirados e em seguida um novo meio suplementado (5 mL) foi adicionado à garrafa.

- Repique e Manutenção das Células

Após atingirem próximo a confluência (aproximadamente de 80 a 90 % da população celular), foi realizado o repique/subcultivo dessas células. O meio foi retirado das garrafas com o auxílio de uma bomba de vácuo e uma pipeta Pasteur e descartados, as células que permaneciam aderidas na garrafa foram lavadas com 3 mL de PBS com a finalidade de remover totalmente o meio de cultivo que estava presente, o PBS foi removido e da mesma forma descartado e então 1 mL de tripsina foi adicionado, homogeneizado e acondicionado na estufa por um período entre 5 e 10 minutos para que ocorresse o total desprendimento das células. Após este período, a tripsina foi inativada com 1 mL de meio de cultura. Novas garrafas foram previamente preparadas com 5 mL de meio de cultura já suplementados e então os 2 mL de suspensão celular foram divididos, geralmente entre 2 ou 4 garrafas. Este procedimento foi realizado com todas as 3 linhagens e somente após a terceira passagem que elas foram utilizadas nos experimentos.

4.2.1.3. O Ensaio

Inicialmente a garrafa contendo as células foi lavada com PBS, em seguida foi adicionado 1 mL de tripsina e permaneceu na estufa por aproximadamente 7 minutos. Em um tubo cônico foi adicionado 4 mL de meio de cultura, e neste mesmo tubo foi adicionado 1 mL da suspensão celular (contendo a tripsina). Após ressuspender esta solução o tubo foi

centrifugado a 1800 RPM por 5 minutos, o meio foi desprezado e o pellet (FIG. 8) formado no fundo do tubo foi ressuspensão em 1 mL de meio de cultura.

FIGURA 8 - Tubo cônico com meio de cultura e pellet celular formado ao fundo após centrifugação.

Fonte: Da autora - arquivo pessoal.

As células foram contadas (em um microtubo foi adicionado 20 μL de azul de tripiano mais 20 μL da suspensão celular). Na câmara de Neubauer foram adicionados 10 μL desta solução e então obtivemos o número de células por mL.

Após a contagem as células foram resuspensas em meio de cultura, e então foram distribuídas em 48 poços de uma placa de 96, de tal maneira que cada poço com 100 μL , contivesse 5×10^3 de células (BRL 3A), 8×10^3 de HepG2 e 3×10^3 de HTC. Todos os ensaios foram realizados em quadriplicatas e após este procedimento as placas permaneceram na estufa por 48 horas.

Antes do término do período de 48 horas foram preparadas as soluções das substâncias testes (2-ACBs), controles positivos, negativos e brancos.

Concluindo o prazo de crescimento das células na placa, o meio de cultura foi retirado e então 100 μL de cada solução foi adicionada em seus respectivos poços (100, 300 e 500 μM dos compostos testes), repetindo o processo inclusive com as soluções dos controles positivos, negativos e brancos até o final dos 48 poços plaqueados.

A placa novamente foi acondicionada na estufa pelos períodos de 4 horas (para o 1º teste) e 24 horas (2º teste).

Antes do término de cada período em um tubo cônico adicionamos 5 mL de meio de cultura, e num reservatório para micropipetas multicanal (coxinho ou barquinha) reservamos 5 mL de PBS.

Utilizando uma bomba de vácuo todo o conteúdo dos poços foi retirado, 4 poços por vez, e então com o auxílio de uma pipeta multicanal 100 μ L de PBS foram adicionados em cada poço para lavar as células, repetindo este processo até o final dos 48 poços. Da mesma forma (4 poços por vez) o PBS foi retirado e então 100 μ L de meio de cultura foram adicionados novamente em cada poço e então a placa voltou para a estufa onde permaneceu pelo período de 24 horas.

4.2.1.3.1. Etapa de Lise

Após o término do período de 24 horas a placa foi envolta num papel alumínio para que permanecesse com ausência de luz, e então foi centrifugada com velocidade de 1500 RPM por 10 minutos a 20 °C. Um pallet foi formado no canto direito de cada poço e então no lado oposto com o auxílio da bomba de vácuo o sobrenadante foi aspirado. Uma solução de corante (solução EMA - Ehidium monoazide bromide, Life Technologies, Ref. E3474) a uma concentração de 8,5 μ g / ml diluídos em PBS suplementado com 2% de SFB foi preparada e adicionada 50 μ L em cada poço e então a placa de cultura permaneceu no gelo por 30 minutos e as células ficaram expostas a uma fonte de luz de led azul (440-450nm, 30W) para fotoativação dos compostos que foram irreversivelmente associados apenas ao DNA de células não viáveis. Este procedimento teve como objetivo rotular eficientemente as células que não devem ser incluídas na contagem de núcleos e micronúcleos, além de fornecer alguma medida de citotoxicidade. Após este passo, as células receberam PBS com 2% de soro bovino fetal e foi centrifugada para remoção de corante livre (FIG. 9).

FIGURA 9- Microplaca em gelo exposta a foto ativação.
Fonte: Da autora - arquivo pessoal.

Após este procedimento foram adicionados 150 μL de solução I nos 48 poços e novamente a placa foi centrifugada em 1500 RPM por 10 minutos a 20 °C, na sequência o sobrenadante foi retirado e 100 μL da Lise I foi adicionada em cada poço e com o auxílio da pipeta multicanal o conteúdo foi ressuspenso por 10 vezes, a placa permaneceu na estufa por 1 hora. Após este período foram adicionados aos poços 100 μL da solução Lise II e novamente o conteúdo foi ressuspenso por 10 vezes. A placa permaneceu no fluxo em temperatura ambiente e com ausência de luz por mais 30 minutos.

A verificação visual dos eventos foi realizada usando um microscópio de fluorescência (Nikon ECLIPSE TS 100) acoplado a um Lumencor® Mira Light Engine (4-NII-FA), através de um conjunto de filtros com 460-490nm e 500-560 espectros de excitação e emissão, e então finalmente a placa foi ao equipamento citômetro de fluxo (BD CSampler – C6 Flow Cytometer) para leitura (FIG. 10).

FIGURA 10 – Microplaca no equipamento citômetro (BD CSampler – C6 Flow Cytometer) para análise do ensaio do MN.

Fonte: Da autora - arquivo pessoal.

A análise seguiu a metodologia descrita na literatura (Bryce et. al., 2010). Beads foram utilizadas em conjunto com o SYTOX GREEN, como um método padrão para a contagem de micronúcleos. Isto ocorre pela sua característica fenotípica, fazendo uso de esferas fluorescentes como padrão interno para o referido cálculo (MN), garantindo assim a precisão do teste/ensaio.

Resumidamente, os eventos marcados com EMA foram excluídos da contagem total. Os eventos com SYTOX foram avaliados de acordo com seu tamanho (FSC) e fluorescência (FL1) para discriminação entre núcleos e micronúcleos. Pelo menos 20.000 eventos fechados na região dos núcleos foram contados em cada amostra. Os dados foram coletados de dois experimentos independentes em octuplicados como porcentagens de eventos positivos para EMA e eventos MN positivos para SYTOX e os resultados foram dados como mudanças de dobra em comparação com poços de controle (células não tratadas). O índice NBP (Nuclei-to-bead ratios) foi utilizado para encontrar diferenças entre as relações de divisão Celular. A estratégia de detecção da análise é descrita na FIG 11.

FIGURA 11 - Estratégia de estudo. (A) Remoção de detritos celulares; (B) Remoção de duplicados; (C) Região de Beads; (D) Fluorescência mínima de SYTOX de 1/100 do núcleo de G1; (E) Células mortas (EMA +) e (F) Núcleo e regiões de micronúcleos

4.2.1.4. Análises Estatísticas

Após a leitura do equipamento (BD CSampler – C6 Flow Cytometer) os dados foram analisados e através do programa GraphPad Prism 7.0 Os resultados foram comparados usando ANOVA e Bonferroni pós-testes.

4.2.2. Teste de Viabilidade Celular

Os ensaios foram realizados no ICB/USP (Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo) do setor de Biologia Celular e Tecidual e do desenvolvimento, utilizando-se o protocolo de Delinceé et al. (2012) com algumas modificações.

As linhagens hepáticas utilizadas foram descongeladas e cultivadas seguindo o mesmo protocolo de cultivo e manutenção das células utilizado no teste de micronúcleo,

após a terceira passagem quando as garrafas atingiram de 80 a 90% de confluência, o teste foi realizado.

4.2.2.1. Avaliação da Citotoxicidade

As células foram ressuspensas em meio de cultura contendo 10% de SFB, e então distribuídas em placas de 96 poços a uma concentração final de 6×10^3 células/poço de HepG2, 4×10^3 de BRL3A e 2×10^3 de HTC, realizados em triplicatas. O volume final para distribuição nos poços das placas foi de 1,5 mL, respectivamente. Após 24 horas de incubação, foram retirados os meios dos poços e em seguida adicionados aos poços o meio de cultura com os compostos diluídos nas concentrações de 100 μ M, 300 μ M e 500 μ M. No controle positivo foi adicionado meio de cultura, e no controle negativo foi adicionado água destilada.

Exatamente 4 horas antes do término de cada período de incubação dos compostos (24 e 48 horas) retiramos as placas da estufa (sem aspirar o conteúdo do poço) e adicionamos a cada poço CellTiter 96 Aqueous Non-radioactive Cell Proliferation Assay MTS (Promega Corporation G5421), previamente preparadas conforme informa o fabricante e então foi realizada a primeira leitura num leitor de microplaca EON Microplate Espectrofotômetro, e após 48 horas foi repetido o mesmo processo. Na FIG. 12 podemos observar a placa sendo inserida no equipamento.

FIGURA 12 - Microplaca de 96 poços sendo inserida no espectrofotômetro - EON Microplate Proliferation Assay.

Fonte: Da autora, arquivo pessoal.

4.2.2.2. Análises Estatísticas

Após a leitura do equipamento os dados foram avaliados através do programa GraphPad Prism, analisados e comparados utilizando ANOVA.

4.2.3. Teste de Ames

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Genotoxicidade em Micro-organismos – LGM – Centro do Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear / CDTN – CNEN Belo Horizonte – MG, utilizando-se o protocolo de Yamakage et al. (2014) com algumas modificações. A fim de solubilizar as 2-ACBs para os procedimentos do teste de Ames, utilizamos o DMSO como solvente. As concentrações definidas para as substâncias a serem testadas foram de: 83, 27 e 9 µg/placa.

4.2.3.1. Linhagens Utilizadas

As linhagens utilizadas neste estudo foram adquiridas junto à Molecular Toxicology Inc. Molttox[®], Boone, Carolina do Norte, 28607, EUA.

Foram empregadas cinco linhagens bacterianas distintas para avaliar a genotoxicidade, tanto para a 2-dDCB, quanto para a 2-tDCB. As linhagens utilizadas foram: TA-1535, TA-1537, TA- 98 e TA-100 de *S. typhimurium* para detectar mutações pontuais nos sítios de Guanina-Citosina (G-C) (Mortelmans e Zeiger, 2000) (Quadro 4). A linhagem WP2-*uvrA* de *E. coli* foi utilizada para a detecção de mutações pontuais nos sítios de Adenina-Timina (A-T) (Mortelmans e Riccio, 2000) (Quadro 4).

QUADRO 4 – Linhagens de *S. typhimurium* e *E. coli*, tipos de reversões e alvo no DNA

Linhagem	Tipo de Reversão	Alvo no DNA
<i>S. typhimurium</i> TA-98	Mudança na Janela de Leitura	–C–G–C–G–C–G–C–G–
<i>S. typhimurium</i> TA-100 <i>S. typhimurium</i> TA-1535	Substituição em pares de bases	–G–G–G–
<i>S. typhimurium</i> TA-1537	Mudança na Janela de Leitura	–C–C–C–
<i>E. coli</i> WP2- <i>uvr A</i>	Substituição em pares de bases	–T–A–A–

Fonte: Adaptação da ilustração de MORTELMANS e ZEIGER, 2000.

4.2.3.2. Controle Negativo

A OECD (The Organization for economic co-operation and development) e FDA (Food and drug administration) recomendam a utilização do próprio solvente ou veículo empregado na dissolução das amostras que serão testadas (Mortelmans e Zeiger, 2000 e Vedmaurthy, 2012). Neste caso, o DMSO foi selecionado como controle negativo (2% v/v). O controle negativo deve resultar em taxas de reversão equivalentes aos níveis históricos de reversão espontânea para cada linhagem. O potencial genotóxico do DMSO foi avaliado em estudos anteriores e não apresentou efeito de genotoxicidade identificada pelo teste de Ames, e apontou que seu uso não interfere no resultado final (Maron, 1981; Vedmaurthy, 2012).

4.2.3.3. Controle Positivo

Os controles positivos utilizados para cada linhagem basearam-se em publicações da OECD, da FDA, da CETESB, 1993 (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) e de Mortelmans e Zeiger, 2000. Os quadros 5 e 6 apresentam as linhagens bacterianas onde os compostos 2-dDCB e 2-tDCB foram testados, os controles positivos selecionados e a quantidade aplicada por placa em µg considerando os ensaios com a presença e ausência de ativação metabólica (S9- Mix).

QUADRO 5 – Controles positivos utilizados em todas as linhagens estudadas, incluindo a concentração por placa nos ensaios com ausência de ativação metabólica

Linhagem	Com Ausencia de ativação Metabolica	
	Substância Controle +	µg/placa
TA-98	2-Nitrofluoreno	10
TA-100	Azida Sódica	5
TA-1535	Azida Sódica	5
TA-1537	ICR-191	1
WP2- <i>uvr</i> A	4-nitroquinolina-N-óxido	5

Fonte: da autora

QUADRO 6 – Controles positivos utilizados em todas as linhagens estudadas, incluindo concentração por placa nos ensaios na presença de ativação metabólica

Linhagem	Com Presença de ativação Metabolica	
	Substância Controle +	µg/placa
TA-98	2-Aminoantraceno	5
TA-100	2-Aminoantraceno	5
TA-1535	2-Aminoantraceno	10
TA-1537	2-Aminoantraceno	10
WP2- <i>uvr</i> A	2-Aminoantraceno	15

Fonte: da autora

4.2.3.4. O Ensaio

Esse método consiste na exposição das linhagens de teste à substância a ser avaliada diretamente na placa de ágar mínimo, neste caso as 2-dDCBs e 2-tDCBs, com ou sem um sistema de ativação metabólica. Os compostos foram adicionados ao ágar de

superfície (top agar) com biotina e traços de histidina e posteriormente vertidos nas placas de ágar mínimo. No caso da *E. coli* WP2-*uvrA*, o top ágar é suplementado com concentrações-traço de triptofano. Após a solidificação do top ágar, as placas foram previamente identificadas (FIG. 13) semeadas com suas respectivas linhagens e então incubadas a 37 °C por um período de 48 horas (FIG. 14). Ao término do período, o número de colônias revertentes em cada placa foi contado. Na FIG. 15 é possível observar as etapas do teste de forma simplificada. O número de colônias observado nas placas contendo as 2-dDCBs e 2-tDCBs foi comparado com os controles positivos e negativos.

FIGURA 13 – Placas com top ágar solidificado e previamente identificadas

Fonte: Da autora - arquivo pessoal

FIGURA 14 – Placas com as respectivas linhagens bacterianas semeadas em incubação a 37°C pelo período de 48 horas.

Fonte: Da autora – arquivo pessoal

FIGURA 15 - Demonstração das etapas envolvidas no procedimento de incorporação em placas do teste de mutação genética em bactérias

Fonte: Adaptação da ilustração de MORTELMANS e ZEIGER

4.2.3.4.1. Doses Utilizadas

Os valores das doses testadas foram baseados no estudo realizado por Yamakage et al. (2014), os valores estão abaixo das doses que eles testaram e constataram que houve precipitação. Na FIG. 15 pode-se observar que foi utilizado 0,1 mL de solução da substância teste por placa. Como pode ser observado nos quadros 7 e 8, ficaram estabelecidas as concentrações de 2-ACBs por placa para a solução mais concentrada bem como suas diluições, e o valor aproximado em μM .

QUADRO 7 – Doses da 2-dDCB utilizadas no teste em mg/placa e valor aproximado em μM

Dose da 2-dDCB	Concentração de 2-dDCB	
	mg/placa	μM /placa
Dose 1	0,83	3,50
Dose 2	0,27	1,10
Dose 3	0,09	0,37

Fonte: Da autora

QUADRO 8 – Doses da 2-tDCB utilizadas no teste em mg/placa e valor aproximado em μM

Dose da tDCB	Concentração de tDCB	
	mg/placa	μM /placa
Dose 1	0,83	3,10
Dose 2	0,27	1,00
Dose 3	0,09	0,33

Fonte: Da autora

4.2.3.4.2. Fatores a serem avaliados

- Taxas de Reversão

Para todas as linhagens teste, com e sem ativação metabólica, foram obtidas as taxas de reversões dos grupos-teste, do controle positivo e do controle negativo, resultando o número médio de colônias revertentes por placa ($n = 3$) de cada grupo considerando a sua taxa de reversão. Foram comparadas as taxas de reversões dos grupos-teste com as dos grupos-controle, tomando-se como referência as taxas de reversão basal demonstradas no quadro 9 (CETESB, 1993).

QUADRO 9 – Linhagens de *Salmonella typhimurium* e *E. coli* utilizadas no teste de Ames, e suas respectivas taxas basais

Linhagem	Taxa de Reversão Basal	
	com/S9	sem/S9
TA-98	20-75	20-75
TA-100	75-225	75-225
TA-1535	5-20	5-20
TA-1537	5-20	5-20
WP2- <i>uvr A</i>	15-151	15-151

Quando o resultado no teste de mutação reversa for negativo, significa que a substância avaliada não apresenta atividade mutagênica para as cepas nas condições do ensaio (CETESB, 1993). O resultado será considerado negativo quando não for constatada diferença estatisticamente significativa entre o controle negativo e os grupos-teste (Bispo, 2014). A contagem das placas foi realizada utilizando padrões específicos adotados pelo laboratório LGM, do CDTN, por meio de contagem manual com o auxílio de um contador de colônias (Colony Counter). Na FIG. 16 pode ser observado o contador de colônias.

FIGURA 16 – Contagem de uma placa com grande taxa de reversões no equipamento Colony Counter.

Fonte: Da autora - arquivo pessoal.

- Sinais de Toxicidade e Precipitação

Traços de histidina no *top agar*, ou seja, em baixas concentrações favorece, até a sua depleção, que todas as células bacterianas realizem algumas divisões celulares. Tapete de fundo (*background lawn*) é a denominação dada quando as bactérias que não sofrem a reversão da mutação cessam suas divisões e formam no ágar uma camada de microcolônias. Quando há substâncias tóxicas no meio pode ocorrer inibição total ou parcial da formação desse “tapete de fundo”. Os sinais de toxicidade e precipitação foram avaliados inicialmente a olho nu seguida de uma avaliação através de um microscópio invertido (aumento de 40 vezes). Taxas de reversões também foram avaliadas quando comparadas as taxas de reversões dos grupos-teste com a do controle negativo. Quando há diminuição estatisticamente significativa na taxa de reversões dos grupos-teste quando comparadas com o controle negativo, pode indicar citotoxicidade da substância-teste.

4.2.3.5. Análises Estatísticas

As análises de dados foram realizadas através do teste-t Dunnett pois segundo recomendações da U.K. (United Kingdom) Environmental Mutagen Society (Kirkland, 1994) é o método mais indicado para avaliar estatisticamente o teste de mutação reversa em bactérias. Este teste compara um grupo particular com cada um dos grupos restantes, neste caso com o controle negativo. Para cada linhagem bacteriana confrontamos com grupo controle positivo e o negativo, com e sem ativação metabólica. O nível de relevância de dados foi definido como $p < 0,05$. O intuito dessa avaliação foi verificar se o teste estava respondendo satisfatoriamente à presença de substâncias mutagênicas.

5 RESULTADOS

5.1. Ensaio de Micronúcleo

É importante em todo trabalho baseado em células, que sejam realizados regularmente testes de pureza das linhagens. Boas práticas de cultura e técnicas estéreis devem sempre ser utilizadas com o intuito de minimizar ao máximo a possibilidade de contaminações. Exames visuais periódicos através da microscopia também podem reduzir o possível impacto de células contaminantes. Manter a saúde celular é de fundamental importância para uma boa estabilidade e até uma boa reprodutibilidade da avaliação do teste de MN (Bemis et al., 2016).

Para o referido teste, é sugerida a realização com presença e com ausência da fração de S9. Entretanto neste estudo o teste foi realizando apenas com a ausência de S9. Isto porque o possível efeito dos compostos 2-ACBs nas células foi muito similar em ambos os casos, não havendo diferenças significativas conforme observado nos testes realizados por Yamakage et al. (2014).

Um dos controles positivos testados inicialmente foi o DMSO, em conformidade com a norma da OECD. Porém após mostrar resultado de grande toxicidade com relação aos controles CC (Controle Celular) e NaCl o mesmo foi removido das análises (FIG. 17 e 18).

FIGURA 17 – Toxicidade induzida por DMSO (5% v/v) na linhagem BRL3A (Valores expressos em %).

FIGURA 18 - Morte celular na linhagem BRL3A (a), (b) e (c) induzida por DMSO (na ponta da seta é possível observar as Beads utilizadas no teste)

Foram utilizados nos testes de micronúcleos realizados com todas as linhagens controles positivos (Colchicina), negativos (NaCl) e CC (Células que não receberam nenhum tratamento).

5.1.1. Ensaio de Micronúcleo – Linhagem BRL 3A

No período de incubação de 4 horas, podemos observar os efeitos destes controles na linhagem BRL 3A nas FIG. 19 e 22. Não foram observados danos genotóxicos consideráveis nas concentrações avaliadas 100, 300 e 500 μM de ambos os compostos (FIG 19).

Na FIG. 20 observa-se uma discreta morte celular. Possíveis alterações na mudança da velocidade de duplicação/divisão mitótica durante o experimento são mostradas na FIG. 21. A FIG 23 ilustra MN formados após exposição da linhagem BRL 3A às concentrações de 2dDCB enquanto a FIG 24 mostra a mesma avaliação para as concentrações de 2tDCB.

FIGURA 19 - MN formados após a linhagem receber o tratamento com os compostos 2-dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μM . Colchicina, NaCl e CC foram utilizados como controles (Valores expressos em %). (*): $p < 0.05$.

FIGURA 20 -% de células não viáveis (mortas) após a linhagem BRL 3A receber o tratamento com os compostos de 2 dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 µM no período de 4 horas.

FIGURA 21 - Relação de núcleos-Beads na linhagem BRL 3A exposta a 4 horas com os compostos 2dDCB ou 2-tDCB (100, 300 e 500 µM).

FIGURA 22 - Controles utilizados: (a) Linhagem BRL3A sem receber nenhum tratamento, (b) Células tratadas somente com NaCl, (c) células tratadas com Colchicina (Na ponta da seta micronúcleos encontrados).

FIGURA 23 – Linhagem BRL3A tratada com: (a) 100 µM, (b) 300 µM e (c) 500 µM de 2-dDCB, período de incubação de 4 horas (Na ponta da seta micronúcleos encontrados).

FIGURA 24 – Linhagem BRL3A tratada com: (a) 100 μ M, (b) 300 μ M e (c) 500 μ M de 2-tDCB, período de incubação de 4 horas (Na ponta da seta micronúcleos encontrados).

O mesmo procedimento foi adotado para o período de incubação de 24 horas, incluindo os mesmos parâmetros e controles. Da mesma forma, nenhum efeito genotóxico foi observado em ambos compostos (FIG 25). Na FIG 26, pode-se observar o índice de morte celular e na FIG 27 possíveis alterações de na velocidade de duplicação/divisão mitótica.

Os controles e seus impactos nas células estão demonstrados na FIG 28, onde pode ser observado a formação de MN bem como morte celular.

Não foram notados efeitos genotóxicos nas concentrações 100, 300 e 500 μ M, após as células receberem os tratamentos dos compostos 2-dDCB (FIG 29) e 2-tDCB (FIG 30).

FIGURA 25 - MN formados após a linhagem BRL 3A receber o tratamento com os compostos 2-dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 µM. Colchicina, NaCl e CC foram utilizados como controles (Valores expressos em %). Período de incubação: 24 horas. (***): $p < 0.001$.

FIGURA 26 - % de células não viáveis (mortas) após a linhagem celular receber o tratamento com os compostos de 2 dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 µM no período de 24 horas.

FIGURA 27 - Relação de núcleos-Beads na linhagem BRL 3A exposta a 24 horas com os compostos 2dDCB ou 2-tDCB (100, 300 e 500 µM).

FIGURA 28 - Controles utilizados: (a) Linhagem BRL 3A sem receber nenhum tratamento (CC), (b) Células tratadas com NaCl, (c) células tratadas com Colchicina, período de incubação de 24 horas. Nas pontas das setas micronúcleos. Símbolos expressos em cruzes indicam células mortas encontradas.

FIGURA 29 - Linhagem celular BRL 3A tratada nas concentrações: (a) 100 μM , (b) 300 μM e (c) 500 μM de 2-dDCB, período de incubação de 24 horas (Na ponta da seta micronúcleo encontrado).

FIGURA 30 – Linhagem celular BRL 3A tratada em concentrações: (a) 100 μM , (b) 300 μM e (c) 500 μM 2-tDCB, período de incubação de 24 horas Nas pontas das setas, micronúcleos encontrados.

5.1.2. Ensaio de Micronúcleo – Linhagem HepG2

Em continuidade aos experimentos, repetiu-se os testes para uma outra linhagem celular: a HepG2. Adotou-se os mesmos procedimentos realizados com a linhagem BRL 3A, com períodos de incubação de 4 e 24 horas de ambos os compostos.

Os efeitos dos controles e compostos na linhagem HepG2, para o período de incubação de 4 horas, é observado nas FIG 31 e 34. Da mesma forma que na linhagem anterior avaliada, não foram observados danos genotóxicos consideráveis nas concentrações avaliadas 100, 300 e 500 μ M de ambos os compostos (FIG 31).

Na FIG 32 observa-se uma discreta inibição na proliferação celular. Mudanças na velocidade de duplicação/divisão mitótica celular são mostrados na FIG. 33. A FIG 35 ilustra morte celular após a exposição da linhagem HepG2 às concentrações de 2dDCB enquanto a FIG 36 mostra a presença de MN e morte celular para as concentrações de 2tDCB.

FIGURA 31 - MN formados após a linhagem HepG2 receber tratamento com os compostos de 2 dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M, período de incubação de 4 horas. Colchicina, NaCl e CC (controle celular) foram utilizados como controles (valores expressos em%). (*): $p < 0.05$.

FIGURA 32 -% de células não viáveis (mortas) após a linhagem celular receber o tratamento com os compostos de 2 dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 µM no período de 4 horas (*): $p < 0.05$. (**): $p < 0.01$. (****): $p < 0.0001$.

FIGURA 33 - Relação de núcleos-Beads na linhagem HepG2 exposta a 4 horas com os compostos 2dDCB ou 2-tDCB (100, 300 e 500 µM). (****): $p < 0,0001$.

FIGURA 34 - Controles utilizados: (a) Linhagem HepG2 sem receber nenhum tratamento (CC). Na ponta da seta uma bead encontrada, (b) Células tratadas com NaCl, (c) células tratadas com Colchicina. Na ponta da seta micronúcleo encontrado. Símbolo expresso em cruz indica célula morta.

FIGURA 35 - Linhagem celular HepG2 tratada nas concentrações: (a) 100 µM, (b) 300 µM e (c) 500 µM de 2-dDCB, período de incubação de 4 horas. Símbolos em cruzes indicam células mortas encontradas.

FIGURA 36 – Linhagem celular HepG2 tratada em concentrações: (a) 100 μ M, (b) 300 μ M (na ponta da seta de ambos, beads encontradas) e (c) 500 μ M 2-tDCB, período de incubação de 4 horas. Símbolo em cruz indica a presença de célula morta.

Da mesma forma ocorreu no período de incubação de 24 horas, utilizando os mesmos parâmetros e controles determinados, novamente, nenhum efeito foi observado (FIG 37 e 40).

Os mesmos padrões foram seguidos e nenhum dano genotóxico foi observado nas concentrações avaliadas 100, 300 e 500 μ M de ambos os compostos (FIG 37).

Não ocorreu inibição na proliferação celular (FIG 38). Não se observam alterações na mudança da velocidade de duplicação/divisão mitótica celular - FIG. 39. A FIG 41 ilustra a presença de MN após a exposição da linhagem HepG2 às concentrações de 2dDCB enquanto a FIG 42 mostra a presença de MN e morte celular para as concentrações de 2tDCB.

FIGURA 37 - MN formados após a linhagem HepG2 receber tratamento com os compostos de 2 dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 µM, período de incubação de 24 horas. Colchicina, NaCl e CC (controle celular) foram utilizados como controles (valores expressos em%). (**): $p < 0.01$.

FIGURA 38 - % de células não viáveis (mortas) após a linhagem celular receber o tratamento com os compostos de 2 dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 µM no período de 24 horas (****): $p < 0.0001$.

FIGURA 39 - Relação de núcleos-Beads na linhagem HepG2 exposta a 24 horas com os compostos 2dDCB ou 2-tDCB (100, 300 e 500 µM). (*): $p < 0.05$.

FIGURA 40 - Controles utilizados: (a) Linhagem HepG2 sem receber nenhum tratamento (CC), (b) Células tratadas com NaCl, na ponta da seta micronúcleo encontrado (c) células tratadas com Colchicina, na ponta da seta bead localizada. Incubadas pelo período de 24 horas. Símbolo expresso em cruz indica célula morta encontrada.

FIGURA 41 - Linhagem celular HepG2 tratada nas concentrações: (a) 100 μM , (b) 300 μM e (c) 500 μM de 2-dDCB, período de incubação de 24 horas. (Na ponta da seta micronúcleo encontrado). Símbolo em cruz indica célula morta.

FIGURA 42 – Linhagem celular HepG2 tratada em concentrações: (a) 100 μM , na ponta da seta bead localizada, (b) 300 μM , na ponta da seta micronúcleo encontrado e (c) 500 μM 2-tDCB, símbolo em cruz indica célula morta. Período de incubação de 24 horas.

5.1.3. Ensaio de Micronúcleo – Linhagem HTC

Novamente tomou-se outra linhagem para a repetição dos testes. Desta vez avaliamos a linhagem HTC (células derivadas de tumores de fígado de ratos). Os mesmos procedimentos realizados nas linhagens anteriores foram adotados, com os mesmos períodos de incubação, ou seja, de 4 e 24 horas para ambos os compostos.

As FIG 43 e 46 mostram os efeitos dos controles e compostos na linhagem HTC, para o período de incubação de 4 horas. Nas concentrações estudadas (100, 300 e 500 μ M de 2-dDCB e 2-tDCB), nenhum dano genotóxico foi observado conforme FIG 43.

Na FIG 44 não se observa ocorrência de morte celular. Alterações na velocidade de duplicação/divisão mitótica celular não foram notadas (FIG. 45). A formação de MN pode ser observada na FIG 47 quando as células da linhagem HTC foram expostas às concentrações de 2dDCB e na FIG 48 quando expostas à 2tDCB.

FIGURA 43 - MN formados após a linhagem HTC receber tratamento com os compostos de 2 dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M, período de incubação de 4 horas. Colchicina, NaCl e CC (controle celular) foram utilizados como controles (valores expressos em%). (**) $p < 0.05$.

FIGURA 44 -% de células não viáveis (mortas) após a linhagem celular HTC receber o tratamento com os compostos de 2 dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 µM no período de 4 horas. (***) : $p < 0.001$.

FIGURA 45 - Relação de núcleos-Beads na linhagem HTC exposta a 4 horas com os compostos 2dDCB ou 2-tDCB (100, 300 e 500 µM).

FIGURA 46 - Controles utilizados: (a) Linhagem HTC sem receber nenhum tratamento (CC), (b) Células tratadas com NaCl, na ponta da seta bead, (c) células tratadas com Colchicina, presença de micronúcleo indicada com a seta. Incubadas pelo período de 4 horas.

FIGURA 47 - Linhagem celular HTC tratada nas concentrações: (a) 100 µM, (b) 300 µM e (c) 500 µM de 2-dDCB, período de incubação de 4 horas. (Na ponta da seta micronúcleo encontrado).

FIGURA 48 – Linhagem celular HTC tratada em concentrações: (a) 100 μ M, (b) 300 μ M, em ambas figuras, micronúcleo na ponta da seta e (c) 500 μ M, na ponta da seta bead, 2-tDCB, período de incubação de 4 horas.

Por fim, no período de incubação de 24 horas, a linhagem HTC foi exposta aos controles e às concentrações de 2ACBs e realmente não houve nenhum impacto genotóxico causado pelas concentrações dos compostos testes avaliados (FIG 49 e 52).

Os mesmos padrões foram seguidos e nenhum dano genotóxico foi observado nas concentrações avaliadas 100, 300 e 500 μ M de ambos os compostos (FIG 49).

Não houve inviabilidade considerável das células conforme FIG 50. Não se observam alterações na velocidade de duplicação/divisão mitótica celular, conforme FIG. 51. A presença de MN pode ser observada na FIG 53 após a exposição da linhagem HTC às concentrações de 2dDCB e na FIG 54 para as concentrações de 2tDCB.

FIGURA 49 - MN formados após a linhagem HTC receber tratamento com os compostos de 2 dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 µM, período de incubação de 24 horas. Colchicina, NaCl e CC (controle celular) foram utilizados como controles (valores expressos em%). (**) $p < 0.05$.

FIGURA 50 - % de células não viáveis (mortas) após a linhagem celular HTC receber o tratamento com os compostos de 2 dDCB e 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 µM no período de 24 horas (****): $p < 0.0001$.

FIGURA 51 - Relação de núcleos-Beads na linhagem HTC exposta a 24 horas com os compostos 2dDCB ou 2-tDCB (100, 300 e 500 µM). (***): $p < 0.001$.

FIGURA 52 - Controles utilizados: (a) Linhagem HTC sem receber nenhum tratamento (CC), (b) Células tratadas com NaCl, (c) células tratadas com Colchicina, incubadas pelo período de 24 horas. Na ponta da seta micronúcleo encontrado. Símbolo em cruz indica célula morta encontrada.

FIGURA 53 - Linhagem celular HTC tratada nas concentrações: (a) 100 μM , (b) 300 μM e (c) 500 μM de 2-dDCB, período de incubação de 24 horas. (Nas pontas das setas micronúcleos encontrados).

FIGURA 54 – Linhagem celular HTC tratada em concentrações: (a) 100 μM , (b) 300 μM , nas pontas das setas, micronúcleos encontrados; e (c) 500 μM , na ponta da seta, bead; 2-tDCB, período de incubação de 24 horas.

5.2. Teste de Viabilidade Celular

De acordo com a norma ISO 10993:5 publicada em 2009, a redução da viabilidade celular em mais de 30% é considerada efeito citotóxico.

5.2.1. Avaliação da 2-dDCB – 24h

Os resultados apresentados na FIG. 55 ilustraram o efeito citotóxico da 2-dDCB em 24h. Todas as linhagens estudadas (BRL3A, HepG2 e HTC) apresentaram ligeira sensibilidade na concentração de 500 μ M, porém não foram observados nenhuma citotoxicidade conforme a norma ISO 10993-5.

FIGURA 55 – Viabilidade nas linhagens BRL 3A, HepG2 e HTC após exposição a 2-dDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M. Resultados comparados ao controle, onde as células não receberam nenhum tratamento, considerado 100% de viabilidade. Período de incubação 24h (Valores expressos em %).

5.2.2. Avaliação da 2-dDCB – 48h

Os resultados apresentados na FIG. 56 mostraram os efeitos da 2-dDCB em 48h. Para linhagem BRL3A foi observada discreta sensibilidade a partir da concentração de 300 μ M. Na HepG2, aproximadamente 25% das células foram sensíveis na concentração de 500 μ M. Citotoxicidade de fato só foi observada na linhagem celular HTC na concentração 500 μ M, pois apresentou somente 45% de viabilidade.

FIGURA 56 – Viabilidade nas linhagens BRL 3A, HepG2 e HTC após exposição a 2-dDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 μ M. Resultados comparados ao controle, onde as células não receberam nenhum tratamento, considerado 100% de viabilidade. Período de incubação 48h (Valores expressos em %).

5.2.3. Avaliação da 2-tDCB – 24h

Na FIG. 57 podemos observar que o efeito do composto 2-tDCB em 24h aparece na linhagem BRL3A a partir de 300 μ M e na linhagem HTC o efeito foi apenas observado quando houve exposição à concentração de 500 μ M, porém em ambos os casos o efeito foi muito sutil, não sendo considerado citotóxico de acordo com a norma da ISO 10993-5.

FIGURA 57 – Viabilidade nas linhagens BRL 3A, HepG2 e HTC após exposição a 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 µM. Resultados comparados ao controle, onde as células não receberam nenhum tratamento, considerado 100% de viabilidade. Período de incubação 24h (Valores expressos em %).

5.2.4. Avaliação da 2-tDCB – 48h

A FIG. 58 nos mostra os efeitos citotóxicos em 48h. A linhagem BRL3A apresentou sensibilidade apenas na concentração de 300 µM. Na HepG2, não se observa sensibilidade a nenhuma concentração exposta, enquanto que a linhagem HTC apresentou citotoxicidade apenas na concentração de 500 µM.

FIGURA 58 – Viabilidade nas linhagens BRL 3A, HepG2 e HTC após exposição a 2-tDCB nas concentrações de 100, 300 e 500 µM. Resultados comparados ao controle, onde as células não receberam nenhum tratamento, considerado 100% de viabilidade. Período de incubação 48h (Valores expressos em %).

Nos quadros 10 e 11 podemos observar os efeitos citotóxicos em percentagem (%) bem como o desvio padrão para cada linhagem expostas aos compostos 2-dDCB e 2-tDCB nas diferentes concentrações testadas em 24 e 48 horas.

QUADRO 10 – Resultados do efeito citotóxico em percentagem (%) do composto 2-dDCB em 24 e 48 horas

Composto	Linhagem	Concentração µM	Viabilidade	
			24h	48h
2-dDCB	BRL 3a	100	100,0% ± 27,64	98,2% ± 13,81
		300	100,0% ± 27,72	86,3% ± 20,27
		500	96,8% ± 49,26	84,8% ± 17,12
	Hep G2	100	100,0% ± 2,75	100,0% ± 19,08
		300	100,0% ± 14,79	100,0% ± 32,40
		500	96,5% ± 22,23	76,0% ± 19,00
	HTC	100	100,0% ± 3,12	100,0% ± 6,93
		300	100,0% ± 19,16	100,0% ± 2,36
		500	84,7% ± 24,24	42,7% ± 23,85

QUADRO 11 – Resultados do efeito citotóxico em percentagem (%) do composto 2-tDCB em 24 e 48 horas

Composto	Linhagem	Concentração μM	Viabilidade	
			24h	48h
2-tDCB	BRL 3A	100	100,0% $\pm$ 4,80	93,1% $\pm$ 11,86
		300	88,5% $\pm$ 31,55	68,7% $\pm$ 10,86
		500	81,1% $\pm$ 16,95	100,0% $\pm$ 31,51
	Hep G2	100	100,0% $\pm$ 22,41	100,0% $\pm$ 17,25
		300	100,0% $\pm$ 6,67	100,0% $\pm$ 19,38
		500	100,0% $\pm$ 22,11	100,0% $\pm$ 29,65
	HTC	100	100,0% $\pm$ 26,69	100,0% $\pm$ 8,12
		300	100,0% $\pm$ 19,19	100,0% $\pm$ 8,78
		500	84,6% $\pm$ 6,64	16,9% $\pm$ 5,86

5.3. Teste de Ames

5.3.1. Ilustrações do teste de Ames com 2-dDCB e linhagem TA-98

Apenas a título de ilustração a FIG. 59 apresenta fotos obtidas durante o experimento do teste de Ames com a linhagem TA-98 com o composto 2-dDCB com ativação metabólica e a FIG. 60 apresenta fotos com a mesma linhagem e mesmo composto utilizados sem ativação metabólica.

Na FIG. 59 podem ser observados:

- A) Placa do controle positivo, com taxa de 2.112 reversões;
- B) Placa do controle negativo, com taxa de 55 reversões, normal para a linhagem que é entre 20 e 75 reversões;
- C) Dose 1 do composto 2-dDCB (83 μg /placa) com taxa de 96 reversões, valor abaixo do dobro que apresentou a placa do controle negativo;
- D) Dose 2 do composto 2-dDCB (27 μg /placa) com taxa de 67 reversões, valor bem próximo do resultado do controle negativo;
- E) Dose 3 do composto 2-dDCB (9 μg /placa) com taxa de 43 reversões, resultado abaixo do controle negativo.

Na FIG. 60 podem ser observados:

- A) Placa do controle positivo, com taxa de 1.840 reversões;
- B) Placa do controle negativo, com taxa de 69 reversões, valor também normal para a linhagem que é entre 20 e 75 reversões;
- C) Dose 1 do composto 2-dDCB (83 $\mu\text{g/placa}$) com taxa de 55 reversões, valor abaixo do dobro que apresentou a placa do controle negativo;
- D) Dose 2 do composto 2-dDCB (27 $\mu\text{g/placa}$) com taxa de 63 reversões, valor bem próximo do resultado do controle negativo;
- E) Dose 3 do composto 2-dDCB (9 $\mu\text{g/placa}$) com taxa de 45 reversões, resultado abaixo do controle negativo.

FIGURA 59 – Ilustração das taxas de reversões em placas do Teste de AMES para o composto 2-dDCB com a linhagem TA-98 COM sistema de ativação metabólica (S9). (A) Controle positivo; (B) Controle negativo; (C) Dose 1; (D) Dose 2 e (E) Dose 3

FIGURA 60 – Ilustração das taxas de reversões em placas do Teste de AMES para o composto 2-dDCB com a linhagem TA-98 SEM sistema de ativação metabólica. (A) Controle positivo; (B) Controle negativo; (C) Dose 1; (D) Dose 2 e (E) Dose 3

5.3.2. Ilustrações do teste de Ames com 2-tDCB e linhagem TA-100

Na FIG. 61 estão ilustradas fotos das placas com a linhagem TA-100 utilizando o composto 2-tDCB com ativação metabólica, e na ausência estão ilustrados na FIG. 62.

Na FIG. 61 podem ser observados:

- A) Placa do controle positivo, com taxa de 1.448 reversões;
- B) Placa do controle negativo, com taxa de 126 reversões, normal para a linhagem que é entre 75 e 225 reversões;
- C) Dose 1 do composto 2-tDCB (83 µg/placa) com taxa de 107 reversões, valor abaixo do que apresentou a placa do controle negativo;
- D) Dose 2 do composto 2-tDCB (27 µg/placa) com taxa de 124 reversões, valor bem próximo do resultado do controle negativo;
- E) Dose 3 do composto 2-tDCB (9 µg/placa) com taxa de 136 reversões, resultado também dentro dos valores normais para o controle negativo.

Na FIG. 62 podem ser observados:

- A) Placa do controle positivo, com taxa de 2.496 reversões;
- B) Placa do controle negativo, com taxa de 95 reversões, valor também normal para a linhagem que é entre 75 e 225 reversões;
- C) Dose 1 do composto 2-tDCB (83 µg/placa) com taxa de 136 reversões, valor acima do que apresentou o controle negativo, porém está dentro da normalidade;
- D) Dose 2 do composto 2-tDCB (27 µg/placa) com taxa de 141 reversões, dentro dos parâmetros negativos;
- E) Dose 3 do composto 2-tDCB (9 µg/placa) com taxa de 103 reversões, valor também bem próximo ao controle negativo.

FIGURA 61 – Ilustração das taxas de reversões em placas do Teste de AMES para o composto 2-tDCB com a linhagem TA-100 COM sistema de ativação metabólica. (A) Controle positivo; (B) Controle negativo; (C) Dose 1; (D) Dose 2 e (E) Dose 3

FIGURA 62 – Ilustração das taxas de reversões em placas do Teste de AMES para o composto 2-tDCB com a linhagem TA-100 SEM sistema de ativação metabólica. (A) Controle positivo; (B) Controle negativo; (C) Dose 1; (D) Dose 2 e (E) Dose 3

5.3.3. *S. typhimurium* TA-98

O detalhamento dos testes de mutação reversa em bactérias para 2-dDCB e 2-tDCB, com a linhagem TA-98, encontram-se nas TAB. 4 e 5.

TABELA 4 – Resultados do teste de Ames para **2-dDCB** utilizando a linhagem TA-98 de *S. typhimurium*, SEM e COM ativação metabólica

Linhagem TA-98, sem S9-Mix	Reversões por Placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
Controle (+) Azida Sódica (5 µg/placa)	1896	1840	3128	2288	728
Dose 1 - (3,50 µM/placa)	59	55	53	56	3
Dose 2 - (1,10 µM/placa)	67	63	62	64	3
Dose 3 - (0,37 µM/placa)	45	45	67	52	13
Controle -	65	69	56	63	7
Linhagem TA-98, com S9-Mix	Reversões por placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
2-aminoantraceno (5 µg/placa)	1736	2112	2096	1981	213
Dose 1 - (3,50 µM/placa)	79	96	87	87	9
Dose 2 - (1,10 µM/placa)	62	67	42	57	13
Dose 3 - (0,37 µM/placa)	78	43	85	69	23
Controle -	64	55	102	74	25

TABELA 5 – Resultados do teste de Ames para **2-tDCB** utilizando a linhagem TA-98 de *S. typhimurium*, SEM e COM ativação metabólica

Linhagem TA-98, sem S9-Mix	Reversões por Placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
Azida Sódica (5 µg/placa)	1896	1840	3128	2288	728
Dose 1 - (3,10 µM/placa)	56	56	69	60	8
Dose 2 - (1,00 µM/placa)	75	63	69	69	6
Dose 3 - (0,33 µM/placa)	49	77	61	62	14
Controle -	65	69	56	63	7
Linhagem TA-98, com S9-Mix	Reversões por Placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
2-aminoantraceno (5 µg/placa)	1736	2112	2096	1981	213
Dose 1 - (3,10 µM/placa)	76	66	54	65	11
Dose 2 - (1,00 µM/placa)	80	78	84	81	3
Dose 3 - (0,33 µM/placa)	72	61	72	68	6
Controle -	64	55	102	74	25

5.3.4. *S. typhimurium* TA-100

O detalhamento dos testes de mutação reversa em bactérias para 2-dDCB e 2-tDCB, com a linhagem TA-100, encontram-se nas TAB. 6 e 7.

TABELA 6 – Resultados do teste de Ames para **2-dDCB** utilizando a linhagem TA-100 de *S. typhimurium*, SEM e COM ativação metabólica

Linhagem TA-100, sem S9-Mix	Reversões por Placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
Controle (+) Azida Sódica (5 µg/placa)	1816	2104	2496	2139	341
Dose 1 - (3,50 µM/placa)	136	104	124	121	16
Dose 2 - (1,10 µM/placa)	117	165	141	141	24
Dose 3 - (0,37 µM/placa)	138	138	166	147	16
Controle (-)	65	69	56	63	7
Linhagem TA-100, com S9-Mix	Reversões por placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
Controle (+) 2-aminoantraceno (5 µg/placa)	2776	1448	2032	2085	666
Dose 1 - (3,50 µM/placa)	157	108	0	88	80
Dose 2 - (1,10 µM/placa)	124	167	121	137	26
Dose 3 - (0,37 µM/placa)	133	67	96	99	33
Controle (-)	123	126	115	121	6

TABELA 7 – Resultados do teste de Ames para **2-tDCB** utilizando a linhagem TA-100 de *S. typhimurium*, SEM e COM ativação metabólica

Linhagem TA-100, sem S9-Mix	Reversões por Placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
Controle (+) Azida Sódica (5 µg/placa)	1816	2104	2496	2139	341
Dose 1 - (3,10 µM/placa)	112	103	136	117	17
Dose 2 - (1,00 µM/placa)	121	111	141	124	15
Dose 3 - (0,33 µM/placa)	108	75	103	95	18
Controle (-)	155	210	95	153	58
Linhagem TA-100, com S9-Mix	Reversões por Placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
Controle (+) 2-aminoantraceno (5 µg/placa)	2776	1448	2032	2085	666
Dose 1 - (3,10 µM/placa)	113	107	143	121	19
Dose 2 - (1,00 µM/placa)	120	124	100	115	13
Dose 3 - (0,33 µM/placa)	114	136	134	128	12
Controle (-)	123	126	115	121	6

5.3.5. *S. typhimurium* TA-1535

O detalhamento dos testes de mutação reversa em bactérias para 2-dDCB e 2-tDCB, com a linhagem TA-1535, encontram-se nas TAB. 8 e 9.

TABELA 8 – Resultados do teste de Ames para **2-dDCB** utilizando a linhagem TA-1535 de *S. typhimurium*, SEM e COM ativação metabólica

Linhagem TA-1535, sem S9-Mix	Reversões por Placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
Controle (+) Azida Sódica (5 µg/placa)	1152	1536	1248	1312	200
Dose 1 - (3,50 µM/placa)	27	19	8	18	10
Dose 2 - (1,10 µM/placa)	23	13	12	16	6
Dose 3 - (0,37 µM/placa)	20	15	14	16	3
Controle -	17	9	14	13	4
Linhagem TA-1535, com S9-Mix	Reversões por placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
2-aminoantraceno (5 µg/placa)	52	43	44	46	5
Dose 1 - (3,50 µM/placa)	12	15	11	13	2
Dose 2 - (1,10 µM/placa)	7	9	8	8	1
Dose 3 - (0,37 µM/placa)	4	10	11	8	4
Controle -	6	4	17	9	7

TABELA 9 – Resultados do teste de Ames para **2-tDCB** utilizando a linhagem TA-1535 de *S. typhimurium*, SEM e COM ativação metabólica

Linhagem TA-1535, sem S9-Mix	Reversões por Placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
Azida Sódica (5 µg/placa)	1152	1536	1248	1312	200
Dose 1 - (3,10 µM/placa)	19	8	26	18	9
Dose 2 - (1,00 µM/placa)	14	16	14	15	1
Dose 3 - (0,33 µM/placa)	12	9	6	9	3
Controle -	17	9	14	13	4
Linhagem TA-1535, com S9-Mix	Reversões por Placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
2-aminoantraceno (5 µg/placa)	52	43	44	46	5
Dose 1 - (3,10 µM/placa)	8	8	8	8	0
Dose 2 - (1,00 µM/placa)	6	18	2	9	8
Dose 3 - (0,33 µM/placa)	6	9	14	10	4
Controle -	6	4	17	9	7

5.3.6. *S. typhimurium* TA-1537

O detalhamento dos testes de mutação reversa em bactérias para 2-dDCB e 2-tDCB, com a linhagem TA-1537, encontram-se nas TAB. 10 e 11 respectivamente.

TABELA 10 – Resultados do teste de Ames para **2-dDCB** utilizando a linhagem TA-1537 de *S. typhimurium*, SEM e COM ativação metabólica

Linhagem TA-1537, sem S9-Mix	Reversões por Placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
Controle (+) ICR - 191 - Acridina (1 µg/placa)	211	129	123	154	49
Dose 1 - (3,50 µM/placa)	9	9	8	9	1
Dose 2 - (1,10 µM/placa)	7	6	0	4	4
Dose 3 - (0,37 µM/placa)	8	6	7	7	1
Controle (-)	11	6	2	6	5
Linhagem TA-1537, com S9-Mix	Reversões por placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
Controle (+) 2-aminoantraceno (5 µg/placa)	88	227	205	173	75
Dose 1 - (3,50 µM/placa)	18	10	10	13	5
Dose 2 - (1,10 µM/placa)	6	11	7	8	3
Dose 3 - (0,37 µM/placa)	13	11	9	11	2
Controle (-)	6	5	4	5	1

TABELA 11 – Resultados do teste de Ames para **2-tDCB** utilizando a linhagem TA-1537 de *S. typhimurium*, SEM e COM ativação metabólica

Linhagem TA-1537, sem S9-Mix	Reversões por Placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
Controle (+) ICR - 191 - Acridina (1 µg/placa)	189	120	111	140	43
Dose 1 - (3,10 µM/placa)	5	6	8	6	2
Dose 2 - (1,00 µM/placa)	6	3	7	5	2
Dose 3 - (0,33 µM/placa)	9	3	6	6	3
Controle (-)	8	1	1	3	4
Linhagem TA-1537, com S9-Mix	Reversões por Placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
Controle (+) 2-aminoantraceno (5 µg/placa)	75	212	192	160	74
Dose 1 - (3,10 µM/placa)	9	9	6	8	2
Dose 2 - (1,00 µM/placa)	7	5	5	6	1
Dose 3 - (0,33 µM/placa)	16	5	2	8	7
Controle (-)	4	1	3	3	2

5.3.7. *E. coli* WP2-*uvrA*

E para finalizar o detalhamento dos testes de mutação reversa em bactérias para 2-dDCB e 2-tDCB, com a linhagem WP2-*uvrA* de *E. coli*, encontram-se nas TAB. 12 e 13.

TABELA 12 – Resultados do teste de Ames para **2-dDCB** utilizando a linhagem WP2-*uvrA* de *E. coli*, SEM e COM ativação metabólica

Linhagem WP2- <i>uvrA</i> , sem S9-Mix	Reversões por Placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
4-nitroquinolina-N-óxido (5 µg/placa)	1840	1872	1850	1854	16
Dose 1 - (3,50 µM/placa)	0	0	0	0	0
Dose 2 - (1,10 µM/placa)	35	26	0	20	18
Dose 3 - (0,37 µM/placa)	34	30	36	33	3
Controle -	33	25	17	25	8
Linhagem WP2- <i>uvrA</i> , com S9-Mix	Reversões por placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
2-aminoantraceno (5 µg/placa)	227	175	257	220	41
Dose 1 - (3,50 µM/placa)	0	0	0	0	0
Dose 2 - (1,10 µM/placa)	43	14	0	19	22
Dose 3 - (0,37 µM/placa)	31	15	33	26	10
Controle -	36	30	28	31	4

TABELA 13 – Resultados do teste de Ames para **2-tDCB** utilizando a linhagem WP2-*uvrA* de *E. coli*, SEM e COM ativação metabólica

Linhagem WP2- <i>uvrA</i> , sem S9-Mix	Reversões por Placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
4-nitroquinolina-N-óxido (5 µg/placa)	1840	1872	1880	1864	21
Dose 1 - (3,10 µM/placa)	0	0	0	0	0
Dose 2 - (1,00 µM/placa)	34	8	0	14	18
Dose 3 - (0,33 µM/placa)	53	44	41	46	6
Controle -	33	25	17	25	8
Linhagem WP2- <i>uvrA</i> , com S9-Mix	Reversões por Placa				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	D. Padrão
2-aminoantraceno (5 µg/placa)	227	175	257	220	41
Dose 1 - (3,10 µM/placa)	0	0	0	0	0
Dose 2 - (1,00 µM/placa)	28	52	0	27	26
Dose 3 - (0,33 µM/placa)	24	26	37	29	7
Controle -	36	30	28	31	4

6 DISCUSSÃO

Após décadas de pesquisas, aplicações bastante úteis foram compreendidas em se tratando do processamento por radiação ionizante. Contudo, várias preocupações sobre possíveis efeitos negativos não puderam ser respondidas inicialmente, inclusive quando falamos do tratamento de alimentos por radiação bem como suas aplicações industriais ou aplicações terapêuticas (Ehlermann, 2016).

Deve-se perceber que pelo princípio não existe qualquer tratamento ou atividade que não tenha simultaneamente algum risco ou efeito colateral inesperado, mesmo no tocante à radiação ionizante. No entanto, para irradiação de alimentos o consenso internacional é que os benefícios superam largamente o risco teórico.

Para conhecimento, o processamento por radiação é utilizado há muito tempo em nossas vidas, em diversos campos diferentes, por exemplo:

- Pneus para automóveis
- Tubos para aquecimento de chão
- Tubos para transporte de gás
- Fios e cabos (isolamento)
- Materiais de embalagem (por exemplo, películas termo retráteis)
- Implantes humanos
- Armazenamento de sangue
- Produtos médicos

Evidentemente, não nos alimentamos com pneus nem tão pouco tubos, mas podemos notar que a irradiação está presente em muitas coisas em nossas rotinas e em nossas vidas (Ehlermann, 2016).

Estudos mais aprofundados concluíram que compostos tóxicos são formados, mas em quantidades mínimas, de nenhuma preocupação para consumo de alimentos irradiados. Toda esta avaliação científica completa, revela regularmente que o efeito observado é extremamente pequeno ou apenas não relevante em circunstâncias práticas. Por exemplo, 2-ACBs são potencialmente carcinogênicas, isso é fato, mas é irrelevante sob circunstâncias reais práticas, sendo desta forma seguro para o consumo. A segurança e a salubridade dos alimentos irradiados foram reconfirmadas internacionalmente pela OMS e também pelo Codex Alimentarius em 2003.

Autoridades sublinharam este fato. Apesar disso, a exploração prática do processamento de radiação dos alimentos ainda é escasso; muitos governos são relutantes em permitir que os alimentos irradiados sejam divulgados e também a indústria alimentar não tem se esforçado para trazer os alimentos irradiados para o mercado, demonstrando desta forma aceitação e confiança aos consumidores (Ehlermann, 2016).

Mesmo assim, o comércio varejista de alimentos que são processados por radiação vem crescendo ainda que lentamente ao longo da última década em diversos países, sem resistências ou reações negativas dos consumidores, porém o comércio de alimentos como um todo tem demorado demasiadamente em se tratando de reconhecer este importante fato. A irradiação de alimentos, bem como seus benefícios, tanto de segurança alimentar quanto para o comércio precisa ser mais divulgada de forma convincente, demonstrando os sucessos comerciais para as indústrias. Eliminando desta forma qualquer campo aberto para questionamentos principalmente quando se trata da opinião pública, e um posicionamento concreto e contundente sobre as questões que podem ser interpretadas como negativas referente ao seu possível potencial carcinogênico (Roberts, 2014).

Raul et al. (2002) e Horvatovich et al. (2002) relataram que 2 tipos de alcil (2-tDCB e 2-tDeCB) podem promover coloncarcinogênese. Os autores mencionados se mostraram preocupados ao observar a presença de 2-ACB em células de cólon. Porém, Knoll et al. (2006) afirmaram que a quantidade que passaria através do cólon seria tão pequena que qualquer risco das 2-ACBs seria mínimo, possivelmente muito baixo para ser considerado um potencial impacto que apresentasse valor significativo na saúde humana (Smith et al., 2006). Ao mesmo tempo, os poucos estudos existentes disponíveis sobre possíveis efeitos promotores carcinogênicos das 2-ACBs não são suficientes e são de suma importância que pesquisas sobre suas propriedades toxicológicas e metabólicas fossem mais aprofundadas, por menor que seja o risco, não só em células de cólon como demonstraram estudos já realizados, bem como em todos os órgãos envolvidos no processo digestório e que acumulam gordura, para acalmar definitivamente preocupações públicas relacionadas ao consumo de alimentos irradiados.

Poucos estudos foram realizados referentes à avaliação dos possíveis efeitos genotóxicos das 2-ACBs. Ao que consta na literatura a maior parte dessas avaliações foram feitas por meio do teste do cometa e somente um grupo liderado por Yamakage et al. (2014) utilizou o ensaio do MN para esta finalidade. Diferentemente deste estudo em questão, a técnica utilizada por eles não foi a mesma, bem como o material avaliado. Eles utilizaram a medula óssea e neste trabalho foram utilizadas células hepáticas. A grande e importante

diferença entre o teste do cometa e o ensaio de micronúcleo se dá pelo fato em diferenciar danos reparáveis dos não reparáveis, neste ponto o ensaio do micronúcleo apresenta maior especificidade, pois os danos apresentados são somente os que não serão futuramente reparáveis o que não ocorre com o teste do cometa.

Delincée et al. (1998) realizaram o teste do cometa utilizando células humanas de cólon e observaram danos no DNA provocados pela 2-DCB comparando com células de cólon de rato, mostrando serem mais sensíveis pois um efeito claro de dano genotóxico foi observado, mas também apontou que as concentrações testadas eram superiores aos valores reais possivelmente consumidos pelos seres humanos, afirmando então que os riscos são muito baixos. Posteriormente Delincée et al. (2002) repetiram o teste utilizando a mesma técnica (teste do cometa) com células de cólon HT 29 e HT 29 Clone A, porém testando os possíveis efeitos genotóxicos provocados pela 2-TCB, chegando à conclusão que nenhum dano foi induzido.

Knoll et al. (2006), avaliaram 3 linhagens celulares e verificaram o potencial efeito genotóxico causado por 2-dDCB. Nas células primárias de cólon humano induziu dano sutil no DNA, da mesma forma ocorreu na linhagem LT 97, o composto se mostrou ativo especialmente após 60 min. de incubação, entretanto na HT 29 Clone 19A nenhum dano foi observado.

No trabalho que Hartwing et al. (2007) realizaram, testaram diversas doses em dois períodos, 30 minutos e 24 horas, notaram danos genotóxicos somente após 24 h, e segundo suas conclusões o dano no DNA ocorreu devido ao comprimento da cadeia e grau de insaturação das células utilizadas.

A única equipe que utilizou a técnica do ensaio do micronúcleo para determinar possível genotoxicidade causada pelas 2-ACBs disponível na literatura foi liderado por Yamakage et al. (2014), que fez uso de células derivadas de medula óssea de rato após os mesmos receberem os compostos via oral. O resultado obtido foi negativo para células de medula óssea, importante em se tratando de avaliar efeito sistêmico. O mesmo resultado negativo também ocorreu no teste do cometa realizado por eles. Entretanto, para avaliar os possíveis efeitos genotóxicos em determinado órgão dirigido, diferentemente das células de medula óssea, células alvo são necessárias.

Por não existir nenhum estudo referente a genotoxicidade dos compostos 2-ACBs com as linhagens específicas selecionadas para esta pesquisa, as doses escolhidas para análise foram determinadas tomando como parâmetro dados presentes em estudos anteriores

referente as concentrações de 2-ACBs presentes em alimentos irradiados e possivelmente consumidos (de acordo o quadro 2), porém aumentando sobremaneira em doses altas.

Nos testes de micronúcleos que foram realizados nesta pesquisa foram utilizadas as linhagens BRL3A (células normais de fígado de rato, quantidade por poço 5×10^3), HepG2 (células provenientes de hepatoma humano, quantidade por poço 8×10^3) e HTC (células provenientes de hepatoma de rato, quantidade 3×10^3). A quantidade de células por poço variou entre as linhagens pois cada uma tem velocidade de crescimento distinta das outras, nas células que duplicam mais rapidamente, o volume foi menor, como por exemplo a linhagem HTC. Elas receberam tratamentos com os compostos 2-dDCB e 2-tDCB, nas concentrações de 100, 300 e 500 μM , em períodos de incubação de 4 e 24 horas, não foram observados nenhum dano genotóxico nos parâmetros avaliados.

Nesta pesquisa, foi analisado o efeito citotóxico da 2-ACB em células hepáticas (HepG2, HTC e BRL3A) em 3 concentrações diferentes (100, 300 e 500 μM) sendo que a concentração de 500 μM é considerada um valor demasiadamente alto, muito acima do que supostamente possa ser consumido pelo ser humano, em 2 períodos (24 e 48 horas). A avaliação do efeito de inviabilidade foi realizada através do ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do corante MTS.

Em estudos realizados por Delincée et al. (2002) e Hartwing et al. (2007), utilizando 2-ACB (2-tDeCB / 2-(tetradec'-enil) -ciclobutanona, 2-dDCB / dodecilclibobutanona e 2-TCB / 2-tetradecilciclobutanona) em células tumorais de cólon humano (HT29 e HT29 clone 19A) nas concentrações de 25 à 400 μM não observaram nenhuma alteração significativa. Neste trabalho, foram identificadas ligeiras diferenças nos resultados quando comparados com os estudos de Delincée et al. (2002) e Hartwing et al. (2007). Tomando como parâmetro a norma do ISO 10993:5 (efeito citotóxico considerado acima de 30%), foi observado que em 24 horas, linhagens tratadas com 2-dDCB apresentaram citotoxicidade na HTC em concentração de 500 μM . Em 48 horas a linhagem que apresentou sutil efeito citotóxico foi a BRL3A a partir da concentração de 300 μM . Na concentração de 500 μM foi observado danos na linhagem HTC (em aproximadamente 55% das células).

Já nas linhagens tratadas com 2-tDCB em 24 horas, não foram identificados efeitos citotóxicos. No período de 48 horas a linhagem BRL 3A apresentou alteração somente na concentração de 300 μM e a HTC um considerável efeito foi notado em 500 μM .

Para a realização do teste de Ames utilizamos como referência neste estudo o trabalho realizado por Yamakage et al. (2014) com algumas modificações, a diferença mais

evidente é o fato deles terem utilizado etanol para solubilizar as 2-ACBs, e nesta pesquisa foi o DMSO. Eles realizaram diversos testes com diferentes doses, enquanto neste trabalho os valores escolhidos foram baseados principalmente na disponibilidade de material no momento que a pesquisa foi realizada e, de acordo com o artigo publicado por Yamakage et al. (2014), foram valores menores do que eles testaram e constataram que houve precipitação (valores que não devem ser levados em consideração pois isso faz com que haja interferência na capacidade de exposição da bactéria).

De acordo com o OECD 471 devem ser utilizadas 5 linhagens para o teste de Ames, são elas: TA 1535, TA98, TA100, TA1537 e a PW2-*uvrA*.

No trabalho realizado por Sommers e Mackay (2005) eles não avaliaram efeito nas linhagens PW2-*uvrA* e TA102, que são linhagens que identificam mutações nos sítios AT, com as linhagens estudadas eles puderam identificar mutações somente nos sítios CG, e diferentemente deste trabalho em questão eles não testaram o composto 2-tDCB e utilizaram placas de 6 poços que não é a forma mais recomendada para este teste, principalmente quando se trata de testes pré-clínicos.

Marchioni et al. (2004) além de não avaliar os possíveis efeitos do composto 2-tDCB, utilizou somente as linhagens TA97, TA98 e TA100, não sendo avaliadas as possíveis mutações em outros importantes sítios, e também utilizou etanol para solubilização.

Gadgil et al. (2004) realizaram o teste de Ames em microplacas de 384 poços. Este procedimento ainda não é regulamentado pelo OECD. O teste mostra ser bastante interessante pois apresenta baixo custo, método totalmente automatizado, de fácil leitura pois é colorimétrico, porém não atende a realidade atual para pesquisa de baixa produtividade.

Não foram observados dados estatisticamente relevantes na taxa de reversão para 2-dDCB e 2-tDCB nas concentrações de exposição testadas. As taxas de reversão dos controles negativos se apresentaram de acordo com as médias históricas de outros laboratórios para a linhagem TA-98 (CETESB 1993; Mortelmans; Zeiger, 2000). Os controles positivos apresentaram taxas de reversão significativamente maiores do que as apresentadas pelos controles negativos. Não foram observados evidências de sinais de precipitação ou toxicidade para as concentrações utilizadas.

Assim sendo, muitos estudos sobre processos e aplicações eficientes de preservação de alimentos têm sido bastante explorados. Para auxiliar nesta pesquisa, o Comitê de Irradiação, composto pela FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e para a Agricultura), OMS (Organização Mundial da Saúde) e da AIEA

(Agência Internacional de Energia Atômica), propôs que é seguro utilizar radiação para descontaminação de alimentos. Alimentos irradiados com uma dose inferior a 10 kGy não apresentam riscos tóxicos, portanto a tecnologia de irradiação para descontaminação tem sido sugerida como alternativa altamente segura e eficaz mantendo inalterados padrões aceitáveis de valor nutricional e qualidade sensorial dos alimentos. Portanto, esta tecnologia de irradiação não só pode melhorar a segurança alimentar, mas reduzir consideravelmente perdas econômicas (Lung et al. 2015)

Por fim, é importante ressaltar que a irradiação de determinados alimentos e ingredientes alimentares está regulamentada pela EU (Comunidade Européia) que lista os gêneros alimentícios que podem ser tratados com radiações, os que não podem, bem como as doses máximas de radiação que estes podem receber (dose de radiação absorvida média global de 10 kGy). A rotulagem adequada dos produtos alimentares e ingredientes é exigido a nível da EU, FAO / OMS Codex Alimentarius (Codex Alimentarius) e utilizam métodos de detecção das 2-ACBs como indicadores para verificar se realmente houve o cumprimento da legislação (Breidbach e Ulberth, 2016).

No Brasil, apesar do processo de irradiação alimentar ser autorizado, ainda não temos um órgão regulatório que fiscalize de forma similar ao que se pratica na Europa e Estados Unidos. Esta falta de fiscalização permite que a rotulagem não siga qualquer padrão de informação e dosagem de radiação. É um campo que ainda carece de enorme maturação.

Por isso, estudos como este, têm sido realizados nacionalmente no intuito de padronizar e informar adequadamente o uso de radiação nos alimentos aqui produzidos e distribuídos.

7 CONCLUSÃO

➤ Esta pesquisa foi inédita na aplicação de uma técnica diferenciada de ensaio de MN, utilizando células hepáticas de mamíferos e correspondeu às expectativas, não evidenciando nenhum efeito genotóxico considerável nas 3 linhagens celulares estudadas (BRL3A, HepG2 e HTC) com as doses e tempo avaliados.

➤ Por meio do teste de viabilidade celular podemos concluir que nossos dados, consolidaram os dados existentes na literatura. O emprego deste método mostrou que de fato foram observados efeitos citotóxicos (BRL3A e HTC) das 2-ACBs avaliadas em determinadas concentrações (em 300 μ M e/ou acima), basicamente quando essas concentrações eram aumentadas, mostrando ser dose-dependentes, comparando-se com as células que não receberam nenhum tratamento (consideradas como 100% de viabilidade).

➤ Para avaliação de possíveis efeitos mutagênicos foi utilizado o teste de Ames, considerando os critérios para a definição de um resultado como negativo por não haver dados estatisticamente relevantes na taxa de reversão, assim sendo os compostos 2-ACBs podem ser classificados como não mutagênicos.

Baseado então nos resultados obtidos neste trabalho, as 2-ACBs podem ser consumidas com relativa segurança sob o ponto de vista de possíveis efeitos mutagênicos e genotóxicos, pois não foram encontradas substâncias que causam ambos efeitos nas concentrações testadas detectáveis pelo teste de Ames e pelo ensaio de micronúcleo dos compostos 2-dDCB e 2-tDCB.

8 ESTUDOS FUTUROS

Enfatizamos a necessidade de novos estudos para avaliar importantes acontecimentos notados durante o experimento de viabilidade celular. O fato das células originadas de hepatomas (HepG2 e HTC) apresentarem um aumento considerável na proliferação celular após receberem os compostos 2-dDCB e 2-tDCB é muito importante, e deve ter uma atenção especial. Uma investigação cuidadosa referente aos mecanismos moleculares pelo qual os compostos atuam nas células hepáticas é necessária para se esclarecer a razão deste aumento considerável na proliferação celular. E também da importância na investigação da avaliação toxicológica destes compostos em linhagens celulares derivadas de outros órgãos que acumulam gordura e estão relacionadas com o processo digestivo.

Desta forma, investigando e testando outros órgãos, poderemos atender as exigências da ANVISA com o intuito de criar procedimentos padronizados para o uso, principalmente em se tratando de doses seguras de alimentos irradiados, evidenciando e esclarecendo à comunidade científica e à população em geral as preocupações que podem impactar a saúde pública brasileira.

REFERÊNCIAS

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Capítulo 5 – Cultivo Celular. Disponível em: http://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/capitulo_5_vol2.pdf Acesso: 05/09/2016.

AMERICAN CANCER SOCIETY – Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/liver-cancer/about/what-is-key-statistics.html>. Acesso 16 de Agosto 2017.

ANDERSON, D.; YU, T-W.; MCGREGOS, D.B. Assay responses as indicators of carcinogen exposure. **Mutagenesis** **13**, v6, p. 539-555, 1998.

ANONYMOUS. Irradiated food in school lunches: Public Citizen Critical Mass Energy and Environment Program. Public Citizen 1 – 37. 2002. Disponível em: www.citizen.org. Acesso 23 de Agosto 2016.

AU, W. Expert affidavit on safety issues of irradiated food for school children. Public Citizen 1–5. 2002. Disponível em: www.citizen.org. Acesso em 23 de agosto de 2016.

BARBOSA, B. S.; SANTOS, F. A.; PIMENTEL, M. M. L.; FERNANDES, D. P.; PREXEDES, E. A.; BEZERRA, M. B. Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, p. 334-347, 2015.

BEMIS, J.C.; BRYCE, S. M.; NERM, M.; RASCHKE, M.; SUTTER, A. Best practices for application of attachment cells to in vitro micronucleus assessment by flow cytometry. **Mutation Research**, v. 795, p. 51-59, 2016.

BISPO, A. C. A. **Avaliação do potencial de genotoxicidade da fluortimidina (18F): Teste para mutação gênica em bactérias**. 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. 61 p.

BOESS, F.; KAMBER, M.; ROMER, S.; GASSER, R.; MULLER, D.; ALBERTINI, S.; SUTER, L. Gene Expression in Two Hepatic Cell Lines, Cultured Primary Hepatocytes, and Liver Slices Compared to the in Vivo Liver Gene Expression in Rats: Possible Implications for Toxicogenomics Use of in Vitro Systems. **Toxicology Sciences**. 73, p. 386-402, 2003.

BREIDBACH, A.; ULBERTH, F. Comparative evaluation of methods for the detection of 2-alkylcyclobutanones as indicators for irradiation treatment of cashew nuts and nutmeg. **Food Chemistry**, v. 201, p. 52-58, 2016.

BRYCE, S., SHI, J., NICOLETTE, J., DIEHL, M., SONDEERS, P., AVLASEVICH, S., RAJA, S., BEMIS, J. C., DERTINGER, S. D. High content flow cytometric micronucleus scoring methods is applicable to attachment cell lines. *Environ Mol Mutagen*. v. **51**, pp 260-266. (2010).

CALUCCI, L.; PINZINO, C.; ZANDOMENEGHI, M.; CAPOCCHI, A.; GHIRINGHELLI, S.; SAVIOZZI, F.; GALLESCHI, L. Effects of gamma irradiation on the free radical and antioxidant contents in nine aromatic herbs and spices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 927-934, 2003.

CARRANO, A. V.; THOMPSON, L. H.; STRETKA, D. G.; MINKLER, J. L.; FRONG, S. DNA crosslinking sister chromatid exchange and specific locus mutation. **Mutation Research**, v. 63, p. 175-88, 1979.

CASANOVA, S.; VIEZZER, C.; NAVAIZIO, L.; REVOLTELLA, R.; CELOTTI, L. Metabolic activation of benzo[a]pyrene in two fetal mouse hepatocyte lines: Induction of DNA adducts and micronuclei. **Mutation Research**, v. 367, p. 135-143, 1996.

CLANTON, J.; SUBICHIN, M.; The effects metabolic surgery on fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. **Surgical Clinics of North América**. v. 96, p. 703-715. 2016.

CELL CULTURE BASICS – Handbook. Invitrogen. Disponível em: <http://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>. Acesso: 05 de setembro de 2016.

CETESB – COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Norma técnica L5.620: Mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* – teste de Ames: método de ensaio, p. 40, São Paulo, 1993.

CHINTHALAPALLY, V. R. Do Irradiated Foods Cause or Promote Colon Cancer? Division for cancer prevention, **American health Foundation-Cancer**, 2003.

CODEX, General Standard for irradiated foods – Codex Stan 106 – 1983, Rev. 1-2003. Disponível em http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcode%252FStandards%252FCODEX%2BStan%2B106-1983%252FCXS_106e.pdf Acesso em: 03 de fevereiro de 2016.

CRONE, A. V. J.; HAMILTON, J. T. G.; STEVENSON, M. H. Effect of storage and cooking on the dose response of 2-dodecylcyclobutanone, a potential marker for Irradiated Chicken. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 58 p. 249-252, 1992.

DELINCÉE, H. Analytical methods to identify irradiated food - a review. **Radiation Physics and Chemistry**, vol. 63, p. 455-458, 2002.

DELINCEÉ, H.; SOIKA, CHRISTIANE.; HORVATOVICH, P.; RECHKEMMER, G.; MARQUIONI, Genotoxicity of 2-alkylcyclobutanones, markers for an irradiation treatment in fat-containing food – Part I: cyto- and genotoxic potential of 2-tetradecylcyclobutanone. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 63, p. 431-435, 2002.

DELINCEÉ, H.; SOIKA, C.; HORVATOVICH, P.; HODAPP, C.; RECHKEMMER, G. Cytotoxicité et génotoxicité des 2-alkylcyclobutanones vis à vis des lignées de cellules tumorales humaines (HT 29 et HT 29 cl 19A). **Bundesforschungsanstalt für Ernährung Karlsruhe**, p. 57-72. 2002.

DELINCEE, H.; POOL-ZOBEL, B.L. Genotoxic properties of 2-dodecylcyclobutanone, a compound formed on irradiation of food containing fat. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 52, p. 39-42, 1998.

DONATO, M.T.; TOLOSA L.; GÓMES-LECHÓN, M.J. Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. **Methods in Molecular Biology**, v. 1250, p. 77-93, 2015.

EASTMOND, D.A.; HARTWIG, A.; ANDERSON, D.; ANWAR, W.A; CIMINO, M.C. DOBREV, I.; DOUGLAS, G.R; NOHMI, T.; PHILLIPS, D.H.; VICHES, C. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. **Mutagenesis**, v. 24, p. 341–349, 2009.

EHLERMANN, D. A. E. The RADURA – terminology and food irradiation. **Food Control**, v. 20, p. 526-528, 2009.

EHLERMANN, D. A. E. Wholesomeness of irradiated food. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 129, p. 24-29, 2016.

ESTEVEZ-PEDRO, N. M. **Avaliação in vitro da toxicidade de óleos essenciais da flora Latino-americana candidatos ao uso em cosméticos**. 2013. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – p. 42-47. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-24092015-120519/pt-br.php> > Acesso em: 20 de novembro 2016.

EUROPEAN COMMISSION. 2002. Statement of the Scientific Committee on Food: on a report on 2-alkylcyclobutanones. European Commission, Health & Consumer Protection. Brussels, Belgium. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out135_en.pdf Acesso 23 de outubro 2016.

FANARO, G. B.; HASSIMOTTO, N. M. A.; BASTOS, D. H. M.; VILLAVICÊNCIO, A. L. C. H. Effects of γ -radiation on microbial load and antioxidant proprieties in black tea irradiated with different water activities. **Radiation Physics and Chemistry**, vol. 97, p. 217-222, 2014.

FARKAS, C. M. Special solutions for the immunocompromised. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 129, p. 58-60, 2016.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for Industry and Other Stakeholders Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. Redbook 2000. U.S. Department of Health and Human Services, revised 2007. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM222779.pdf> Acesso em: 12 de dezembro 2015.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M.U. Teste de micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica, **Revista Saúde e Pesquisa**, v.1, n.3, p. 337-340, 2008.

GADGIL, P.; HACHMEISTER, K.; SMITH, J. S.; KROPF, D. H. 2-Alkylcyclobutanones as Irradiation Dose Indicators in Irradiated Ground Beef Patties **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5746-5750, 2002.

GOMES, M. A.; PRIOLLI, D. G.; TRALHÃO, J. G.; BOTELHO, M. F. Carcinoma hepatocelular: Epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, p. 514-524, 2013.

HALLMAN, G.; LOAHARANU, P. Phytosanitary irradiation – Development and application. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 129, p. 39-45, 2016.

HARTWING, A.; PELZER, A.; BURNOUF, D.; TITÉCA, H.; DELINCÉE, H.; BRIVIBA, K.; SOIKA, C.; HODAPP, C.; RAUOL, F.; MIESCH, M.; WERNER, D.; HORVATOVICH, P.; MARCHIONI, E. Toxicological potential of 2-alkylcyclobutanones - specific radiolytic products in irradiated fat-containing food - in bacteria and human cell lines. **Food Chemistry and Toxicology**, v.45, p. 2581-2591, 2007.

HAWLEY, T. S.; HAWLEY, R. G. Flow cytometry protocols. 2. ed. p. 434. Totowa, New Jersey: **Humana Press Inc.**, 2004.

HEALTH CANADA. 2003. Evaluation of the significance of 2-dodecylcyclobutanone and other alkylcyclobutanones. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/fpi-ipa/e-cyclobutanone.html>. Acesso em: 02 de fevereiro 2016.

HORVATOVICH, P. **Formation des 2-alkylcyclobutanones a partir des triglycerides dans les aliments traites par ionisation**. 2001. These Docteur – L'Universite Louis Pasteur de Strasbourg, France. 150 p.

HORVATOVICH, P.; RAUL, F.; MIESCH, M.; BURNOUF, D.; DELINCEE, H.; HARTWIG, A.; WERNER, D.; MARCHIONI, E. Detection of 2-Alkylcyclobutanones, markers of irradiated foods, in adipose tissues of animals fed with these substances. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 1610-1613, 2002.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=330 Acesso 16 de Agosto de 2017.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

IHSANULLAH, I.; RASHID, A. Current activities in food irradiation as a sanitary and phytosanitary treatment in the Asia and the Pacific Region and a comparison with advanced countries. **Food Control**, v. 72, p. 345-359, 2017.

ISO 10993-5 International Standard. Biological evaluation of medical devices – **Part 5: Tests for in vitro Cytotoxicity**. Third edition, 2009.

KIM, K. S.; S. E.O.; H. Y.; LEE, J. M.; PARK, E. R.; KIM, J. H.; HONG, C. H.; BYUN, M. W. Analysis of radiation-induced hydrocarbons and 2-alkylcyclobutanones from dried shrimps (*Penaeus aztecus*). **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 142–147, 2004.

KIM, K-S.; LEE, J-M.; SEO, H-Y.; KIM, J-H.; SONG, H-P.; BYUN, M-W.; KWON, J-H. Radiolytic products of irradiated authentic fatty acids and triacylglycerides. **Radiation Physics and Chemistry**. v. 71, p. 47-51, 2004.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDA TE-JR.; LORGE, E.; NORPPA, H.; SURRALLÉS, J.; HUDE, W.V.D.; WAKATA, A. A Report from the *In Vitro* micronucleus Assay working group. **Environmental and Molecular Mutagenis**, v. 35, p. 167-172, 2000.

KIRKLAND, D. J. Statistical evaluation of mutagenicity test data: recommendations of the U.K. Environmental Mutagen Society. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. 1, p. 43-47, 1994.

KIRKLAND, D. J.; AARDEMA, M.; HENDERSON, L.; MÜLLER, L. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. **Mutation Research**, v. 584, p. 1-2, 2005.

KNOLL, N.; WEISE, A.; CLAUSSEN, U.; SENDT, W.; MARIAN, B.; GLEI, M.; POOL-ZOBEL, B. L. 2-dodecylcyclobutanone, a radiolytic product of palmitic acid, is genotoxic in primary human colon cells and in cells from preneoplastic lesions. **Mutation Research**, v. 594, p. 10-19, 2006.

LETELLIER, P.R.; NAWAR W.W. 2-Alkylcyclobutanones from radiolysis of 335 triglycerides. Short Communication. **Lipids**, v. 7 p 75-76, 1972.

LI, W.; ZHOU, J.; XU, Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices (Review). **Biomedical Reports**, v. 3 p. 617-620, 2015.

LIN, S.; LIN, D. C.; FLANAGAN, M. D. Specificity of the effects of cytochalasin B on transport and motile processes. **Cell Biology**, v. 75, n. 1, p. 329-333, 1978.

LUND, B. M.; O'BRIEN, S. J. The occurrence and prevention of foodborne disease in vulnerable people. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, p. 961-973, 2011.

LUNG, H. M.; CHENG, Y. C.; CHANG, Y. H.; HUANG, H. W.; YANG, B. B.; WANG, C. Y. Microbial decontamination of food by electron beam irradiation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 44, p. 66-78, 2015.

MAHADEVAN B, SNYDER RD, WATERS MD, BENZ RD, KENPER RA, TICE RR, RICHARD AM. Genetic Toxicology in the 21st Century: Reflections and Future Directions. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 52 p. 339-354, 2011.

MARCHIONI, E.; RAUL, D.; BURNOUF, M.; MIESCH, M.; DELINCÉE, H. HARTWIG, A.; WERNER, D. Toxicological study on 2-alkylcyclobutanones – results of a collaborative study. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 71, p. 145-148, 2004.

MARCHIONI, E.; HORVATOVICH, P.; ENNAHAR, S.; NDIAYE, B. Production yields of 2-Alkylcyclobutanones in irradiated foods. In: International Nuclear Atlantic Conference (INAC). Innovations in Nuclear Technology for a Sustainable Future. Rio de Janeiro, RJ. Associação Brasileira de Energia Nuclear (ABEN), 2009.

MARON, D; KATZENELLENBOGEN, J.; AMES, B. N. Compatibility of organic solvents with the Salmonella/Microsome test. **Mutation Research**, v. 88, n. 4, p. 343-350, 1981.

MARON, D. M., AMES, B. N., Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983.

MEASURING CELL VIABILITY/CYTOTOXICITY. Disponível em: <http://www.cientificasenna.com/files/file/Microbial%20Cell%20Proliferation%20Assay.pdf> Acesso em 05 de setembro de 2016.

MORTELMANS, K.; RICCIO, E. S. The bacterial tryptophan reverse mutation assay with Escherichia coli WP2. **Mutation research**, v. 455, n. 1-2, p. 61-69, 2000.

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

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.

NDIAYE, B.; JAMET, G.; MIESCH, M.; HASSELMANN, C.; MARCHIONI, E. 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs II. The CEN (European Committee for Standardization) method: field of application and limit of utilization. **Radiation Physics and Chemistry**. v. 55, p. 437-445, 1999.

OECD - THE ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD Guideline for Testing of Chemicals N° 471 – **Bacterial Reverse Mutation Test. Cultures**. p. 1-11. Paris, France, 1997.

OECD Guideline for testing of chemicals 487-2016 and Guidance Document on Revisions to OECD Genetic Toxicology Test Guidelines - 2016 – Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9716421e.pdf?expires=1507910553&id=id&accname=guest&checksum=F263B943B3088AA1E4F68152FDB4ADDA> Acesso: 05 de setembro de 2016.

PARRY, J. M.; SORS, A. The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: The European Community Aneuploidy Project. **Mutation Research**, v. 287, p. 3-15, 1993.

PATHAK, S.; PANDANABOYANA, S.; DANIELS, I.; SMART, N.; PRASAD, K. R. Obesity and colorectal liver metastases: Mechanisms and management. **Surgical Oncology**, v. 25, p. 246-251, 2016.

PUBLIC HEALTH ENGLAND. Disponível em http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=93120108&collection=ecacc_gc Acesso: 16 de agosto de 2017.

RAUL, F.; GOSSE, F.; DELINCÉE, H.; HARTWIG, A.; MARCHIONI, E.; MIESCH, M.; WERNER, D.; BURNOUF, D. Food-borne radiolytic compounds (-alkylcyclobutanones) may promote experimental colon carcinogenesis. **Nutrition and Cancer**, v. 44, p. 189-191, 2002.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell viability assays. Assay Guidance Manual. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/> Acesso em 10 de janeiro de 2017.

SADIKOVIC, B.; RODENHISER, D. I. Benzopyrene exposure disrupts DNA methylation and growth dynamics in breast cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 216, p. 458-468, 2006.

SCHEFFORD, A.; KERN, F. Recent Developments in flow cytometry. **Journal of Clinical Immunology**, v. 20, n 6, p. 400-407, 2000.

SCHÜTTE, K.; SCHULZ, C.; MALFERTHEINER, P. Nutrition and Hepatocellular Cancer. **Gastrointest Tumors**, v. 2 p. 188-194, 2016.

SETÚBAL, A.M.G.; REIS, S. R. A.; ROBINSON, W. M.; BORGES-OSÓRIO, M. R. Micronúcleo: um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal. **Revista Odonto Ciência- Faculdade de Odontologia/PUCRS**, v.20, n.28, 2005.

SEVERIN, I. V.; HEGARAT, L. L.; LHUGUENOT, I. C.; LE BOM, A. M.; CHAGNON, M. C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 536 p. 79-90, 2003.

SLOCZNSKA, K.; POWROZNIC, B.; PEKALA, E.; WASZKIELEWICZ, A. M. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. **Journal Applied Genetics**, v. 55 p. 273-285, 2014.

SOMMERS, C. H.; SCHIESTL, R. H. 2-Dodecylcyclobutanone Does Not Induce Mutations in the Salmonella Mutagenicity Test or Intrachromosomal Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of food Protection**, v. 67, p. 1293-1298, 2004.

SOMMERS, C.H., MACKAY, W.J. DNA damage-inducible gene expression and formation of 5-fluorouracil-resistant mutants in *Escherichia coli* exposed to 2- dodecylcyclobutanone. **Journal Food and Science**, v. 70, p. C254-C257, 2005.

STEVENSON, M. H.; CRONE, A. V. J.; HAMILTON, J. T. G. Irradiation detection. **Nature**, v. 344, p. 202-203, 1990.

ROBERTS, P. B., Food irradiation is safe: Half a century of studies. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 105, p. 78-82, 2014.

RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAVER, D. **Patologia – Bases Clinicopatológicas da Medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

TAGLIARI, K. C.; CECCHINI, R.; SARIDAKIS, H. O. Teste de Ames como uma ferramenta para detecção de citotoxicidade e mutagenicidade causadas por metais pesados e radicais livres. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 2, p. 41-40, 1999.

TEJS, S. The Ames test: A methodological short review. **Environmental Biotechnology**, v.4, p. 7-14, 2008.

TICE, R. R.; E. AGERELL; D. ANDERSON; B. BURLISON; A. HARTMANN; H. KOBAYASHI; Y. MIYAMAE; E. ROJAS; J. C. RYU; Y. F. SASAKI. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206–221, 2000.

VEDMAURTHY, R. B.; PADMANA, S.; VIJAYAN, M.; ZABIULLAH, A. J.; KUNJUMMAN, J.; NARAYANAN, M. L. Compatibility of different solvents with Salmonella typhimurium mutant strains in bacterial reverse mutation assay. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, 283-284, 2012.

YAMAKAGE, K.; SUI, H.; OHTA, R.; TYOIZUMI, T.; KAWAKAMI, K.; MATSUMOTO, H.; TAKAHASHI, T.; SASAKI, K.; IKEZUMI, M.; NEGISHI, S.; IZUMI, K.; TODORIKI, S.; TAKASHI, K.; FURUTA, M. Genotoxic potencial and in vitro tumour-promoting potential of 2-dodecylcyclobutanone and 2-tetradecylcyclobutanone, two radiolytic products of fatty acids. **Mutation Research**, v. 770, p. 94-104, 2014.

WEAKLEY, S.M.; GIANG, J.; KOUGIAS, P.; LIN, P. H.; YAO, Q.; BRUNICARDI, F.C.; GIBBS, R.A.; CHEN, C. Role of somatic mutations in vascular disease formation. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 10, p. 173–185, 2010.