UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Mecanismos de toxicidade do conteúdo de sinalizadores
luminosos (light-sticks) – formação de adutos com DNA e dano
oxidativo em células em cultura

Amanda Lucila Medeiros da Silva

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro

São Paulo

2010

Amanda Lucila Medeiros da Silva

Mecanismos de toxicidade do conteúdo de sinalizadores
luminosos (light-sticks) – formação de adutos com DNA e dano
oxidativo em células em cultura

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro

São Paulo

2010

Amanda Lucila Medeiros da Silva

Mecanismos de toxicidade do conteúdo de sinalizadores luminosos (light-sticks) –
formação de adutos com DNA e dano oxidativo em células em cultura

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro
orientador/presidente

1°. examinador

2°. examinador

São Paulo, _____ de 2010.

Aos meus pais, meus primeiros
mestres, pelo amor, carinho e apoio
em todos os momentos

Ao Leandro pelo amor e
companheirismo tornando mais leve a
conclusão deste trabalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço a profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro pela orientação científica, pelo exemplo de perseverança no trabalho mesmo nos momentos difíceis, pela companhia no laboratório até altas horas

Aos colaboradores desta pesquisa: Dr. Ivan P. A. Campos (UNIP/SP) pelo auxílio com os dados espectroscópicos; Dra. Raquel Bagattini (UNIP/SP) pela colaboração no experimento com a albumina; Dr. Etelvino J. H. Bechara (IQ/USP, UNIFESP-Diadema, SP) pela doação dos bastões, disposição dos equipamentos do laboratório e constante interesse no desenvolvimento desse trabalho

Ao doutorando Tiago Franco de Oliveira, parceiro de bancada “quebrou muitos galhos”, nossas brincadeiras descontraíram muitas vezes o trabalho e será motivo de saudades. Pois, mesmo com nossas diferenças nós nos respeitamos e somos amigos

Às integrantes do nosso grupo de pesquisa Ana Paula Gusman (iniciação científica) e Carla Baquedano (mestranda) pela amizade

À bibliotecária Leila Aparecida Bonadio pela normatização das referências bibliográficas

Agradeço a adorável Marli Roehsig uma das primeiras pessoas a conhecer na “tóxico” durante a prática profissionalizante. E também a Vânia Rodrigues pela recepção e amizade, ambas inesquecíveis.

À Ana Paula Salum pela companhia nos poucos almoços e pela amizade

Às amigas Simone e Beatriz pela amizade

Ao prof. Dr. Ernani Pinto pela participação no exame de qualificação e uso dos equipamentos de seu laboratório. Aos seus alunos Stella, Vânia, Felipe, Vanessa e Fabyana que me auxiliaram no uso dos equipamentos

Ao Renato, aluno do laboratório da profa. Silvy Stuchi (FCF/USP) pela atenção e ajuda com o microscópio e a câmera

À profa. Dra. Mari C. Sogayar (IQ/USP) e sua técnica Zizi por ceder à linhagem de células estudada

À profa. Dra. Marisa H. G. Medeiros (IQ/USP) por nos permitir usar os equipamentos de seu laboratório. Ao Osmar técnico do laboratório pelo auxílio nos processos de liofilização, cuidado com as amostras e pelas conversas eventuais

Ao prof. Dr. Paolo Di Mascio (IQ/USP) pelo uso dos equipamentos HPLC/MS/MS e MALDI/TOF/MS

Ao Raphael Caio aluno do nosso programa por ceder alguns reagentes

À Adriana técnica do laboratório do Prof. Dr. Etelvino Bechara pela atenção durante as solicitações de experimentos a Central Analítica

Agradeço à todos que contribuíram diretamente durante os experimentos e demais etapas de conclusão deste trabalho

Ao Prof. Ms. Erasmo Soares da Silva grande entusiasta dessa pós-graduação. Apresentou-me a toxicologia, orientou meu trabalho de conclusão de curso, acompanhou meu estágio em toxicologia forense, deu-me coragem para “bater” na porta da toxicologia da FCF/USP, quando tudo começou. Agradeço a este amigo e eterno orientador

Às pessoas que contribuíram indiretamente fortalecendo minha vida pessoal: Aline, minha irmã, Miriam, amiga-irmã, Henrique meu sobrinho que sempre reclamou da minha pouca atenção (agora teremos mais tempo!), Leandro meu amor, que suportou minha ausência em vários momentos durante o desenvolvimento deste trabalho

Aos meus pais que sempre me incentivaram a estudar, proporcionaram o auxílio financeiro quando necessário, mantiveram a paciência nos momentos oportunos, e principalmente pela educação, conselhos e amor

À Deus pela vida, sabedoria e presença contínua.

Muito obrigada!!!

APOIO FINANCEIRO

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

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo

*“A palavra natureza pode voltar a ser sagrada quando já não
houver mais nada, mas sempre resta a esperança de o homem
redescobrir este velho segredo: que a natureza é ele, e ele é a
natureza” (autor desconhecido)*

Resumo

Silva, A. L. M. **Mecanismos de toxicidade do conteúdo de sinalizadores luminosos (light-sticks) – formação de adutos com DNA e dano oxidativo em células em cultura.** Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.

Bastões plásticos quimioluminescentes, chamados *light sticks*, são usados por companhias pesqueiras e descartados nas praias. Moradores locais utilizam seus conteúdos como repelentes, óleo bronzeador e medicamento para dores nas articulações. Nós investigamos a reatividade das soluções de bastões de *light sticks* coletados em praias brasileiras e a toxicidade celular de seus conteúdos e também de soluções de *light stick* de bastões novos. Produtos da reação dos conteúdos de *light stick* descartado com 2'-desoxiguanosina (dGuo) foram analisados por HPLC/UV/ESI-MS/MS. Um aduto foi purificado e caracterizado em espectrômetro de massas por Dissociação Induzida por Colisão (CID) e através de experimentos de ^1H RMN. A estrutura do aduto revelou que o produto de degradação de bis(triclorofenil)oxalato é reativo para nucleófilos *in vitro*. O mesmo aduto foi detectado em DNA de timo de bezerro incubado *in vitro* com a solução do *light stick* descartado pelo uso HPLC/ESI-MS/MS. Além do DNA, albumina também foi modificada pelos conteúdos de *light stick* descartado. Células HepG2 foram incubadas por 16 h com 0.0125% - 0.12% (v/v) das soluções de *light sticks*: (i) coletadas na praia, (ii) obtidas imediatamente após a reação quimioluminescente no laboratório, e (iii) previamente a reação, contendo ou n-butil-ftalato, difenilantraceno, e bis(triclorofenil)oxalato (solução 1), ou dimetil-ftalato, H_2O_2 , e salicilato de sódio (solução 2). A sobrevivência celular foi avaliada pelo teste do XTT, corante cristal violeta e lactato desidrogenase realizados em placas de 96 poços. Com as concentrações testadas foram obtidas significativamente a morte celular. O dano oxidativo ao DNA celular foi avaliado pela análise da 8-oxo-2'-desoxiguanosina através do equipamento HPLC/ESI-MS/MS, que revelou aumento de alterações nas células tratadas com 0.006% das soluções de *light stick* de bastões descartados e novos. Nossos dados apontam genotoxicidade e citotoxicidade das soluções de *light sticks* e podem contribuir como alerta a autoridades públicas para proibição do uso incontrolado. Palavras chave: Citotoxicidade. Células HepG2. Light sticks. 8-oxodGuo. Aduto de DNA.

Abstract

Silva, A. L. M. **Mechanisms of toxicity of the contents of beacons (light-sticks) – DNA adducts formation and oxidative damage in cultured cells.** Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.

Chemiluminescent plastic rods, called *light sticks*, are used by fishery companies and littered on the shores. Local inhabitants use their contents as repellents, tanning oil, and medicine for joint pain. We have investigated the reactivity of spent *light stick* solutions collected on brazilian beaches and the cellular toxicity of their contents as well as that of brand-new *light stick* solutions. Products of the reaction of the spent *light stick* contents with 2'-deoxyguanosine (dGuo) were analyzed by HPLC/UV/ESI-MS/MS. A dGuo adduct was purified and characterized in a Collision Induced Dissociation (CID) mass spectrometer and through ^1H NMR experiments. The adduct structure revealed that a degradation product of bis(trichlorophenyl)oxalate is reactive towards nucleophiles *in vitro*. The same adduct was detected in calf thymus DNA incubated *in vitro* with spent *light stick* solution, by using HPLC/ESI-MS/MS. Besides DNA, albumin was also modified by spent *light stick* contents. HepG2 cells were incubated for 16 h with 0.0125% – 0.12% (v/v) of *light stick* solutions: (i) collected on the beaches, (ii) obtained immediately after the chemiluminescent reaction in the laboratory, and (iii) previously the reaction, containing either *n*-butyl-phthalate, diphenylanthracene, and bis(trichlorophenyl)oxalate (solution 1), or dimethyl-phthalate, H_2O_2 , and sodium salicylate (solution 2). Cell survival was evaluated by the XTT, crystal violet dye, and lactate dehydrogenase assays performed in 96 well plates. The concentrations tested were found to significantly kill cells. Oxidative damage to cellular DNA was assessed by 8-oxo-2'-deoxyguanosine analysis via an HPLC/ESI-MS/MS equipment, which revealed increased changes in cells treated with 0.006% of spent and brand-new *light stick* solutions. Our data point to important genotoxicity and cytotoxicity of the *light stick* solutions and may contribute to alert public policies to ban their uncontrolled use.

Keywords: Cytotoxicity. HepG2 cells. Light sticks. 8-oxodGuo. DNA adduct

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Reação de quimioluminescência indireta do sistema peróxi-oxalato, ocorrida nos bastões de light sticks. Reação iniciada pela oxidação do bis-(triclorofenil)oxalato (TCPO) (a) pelo H_2O_2 , formando um oxalato intermediário, 1,2-dioxetanodiona (b) que complexa-se com o ativador (HPA) e transfere energia a este (c) e é responsável pela emissão de luz, voltando ao estado fundamental (d).22
- Figura 2.** Bastões de light sticks: a) bastão íntegro; b) flexão do plástico para rompimento da ampola interna; c) mistura das soluções e início da emissão de luz e d) bastão sem quimioluminescência.23
- Figura 3.** Estruturas dos 16 principais HPAs citados na literatura.27
- Figura 4.** Redução tetravalente do oxigênio molecular até a formação de água. Várias EROs são formadas no processo. Retirado de Ferreira e Matsubara, 1997..35
- Figura 5.** Estresse oxidativo: desequilíbrio entre antioxidantes e espécies reativas de oxigênio (EROs).36
- Figura 6.** Reações envolvidas no processo de peroxidação lipídica modificado de Ferreira e Matsubara, 1997.37
- Figura 7.** Biomarcadores de estresse oxidativo. Malonaldeído (MDA) e 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo).39
- Figura 8.** Solução interna do LS. Cromatograma obtido com detecção por UV em 255 nm no sistema de HPLC/UV/ESI-MS/MS. Método descrito em Materiais e Métodos, item 3.5.61
- Figura 9.** Espectro de massas do di-n-butil ftalato presente na solução interna de LS (tempo de retenção de ~ 50 min na Figura 8). O espectro foi obtido em MS_2 com seleção dos íons fragmentos de m/z 279.....62
- Figura 10.** Espectros de massas do éster de oxalato presente na solução interna de LS (tempo de retenção de 51 min na Figura 8). A) Espectro obtido em MS_1 com destaque para os íons que indicam a presença de 3 átomos de cloro na molécula. B) Espectro obtido em MS_2 com seleção dos íons fragmentos de m/z 223.....64
- Figura 11.** Espectro de massas dos íons precursores de m/z 223 correspondente ao éster de oxalato presente na solução interna de LS (tempo de retenção de 51 min na Figura 8).....65
- Figura 12.** Espectro de massas indicando a presença do 9,10-difenilantraceno (DPA) na solução interna do *light stick*. O espectro foi obtido em MS_1 66

- Figura 13.** Espectro de absorbância do 9,10-difenilantraceno presente na solução interna do *light stick*. O espectro foi obtido a partir do pico correspondente ao HPA no sistema de HPLC/PDA.67
- Figura 14.** Solução interna do LS. A) Cromatograma obtido com detecção por UV em 255 nm no sistema de HPLC/UV/ESI-MS/MS. B) Cromatograma obtido com seleção do íon m/z 195 no sistema de HPLC/UV/ESI-MS/MS. Método descrito em Materiais e Métodos, item 3.5..68
- Figura 15.** Espectro de massas do solvente presente na solução externa de LS (tempo de retenção de 30 min na Figura 14). O espectro foi obtido em MS₁.....68
- Figura 16.** Soluções de *light stick* analisadas cromatograficamente após reação quimioluminescente (imediatamente após e em dias subsequentes de exposição à luz solar). Cromatogramas obtidos com detecção por UV em 255 nm no sistema de HPLC/UV/ESI/MS-MS. Método descrito em Materiais e Métodos, item 3.5.....69
- Figura 17.** Cromatogramas obtidos com detecção por UV em 255 nm no sistema de HPLC/UV/ESI-MS/MS. O espectro de absorbância do aduto obtido por HPLC/PDA está também apresentado. Método descrito em Materiais e Métodos, item 3.3, utilizando acetonitrila ao invés de metanol..71
- Figura 18.** Espectro de massas obtido em MS₁ do aduto resultante das incubações de solução de *light stick* coletado em praia com dGuo..73
- Figura 19.** Espectros de massas obtidos em MS₂ a partir das fragmentações induzidas por colisão dos íons m/z 408, 410, 292, 294, 274 e 246 do aduto resultante das incubações de solução de *light stick* coletado em praia com dGuo.....74
- Figura 20.** Estrutura sugerida para o aduto resultante das incubações de solução de *light stick* coletado em praia com dGuo. Os fragmentos apresentados foram observados nos espectros de massas de fragmentação induzida por colisão dos íons m/z 408, 410, 292, 294, 274 e 246.....75
- Figura 21.** Cinética de formação do aduto dGuo-*light stick* em função do tempo de incubação (800 μ L tampão fosfato 50 mM, pH 7,4, contendo 1 mg de dGuo, e 200 μ L de solução de *light stick*, 37 °C). Detecção por absorbância em 255 nm.....76
- Figura 22.** Cromatograma obtido pelo sistema HPLC/PDA (λ = 255 nm) com injeção de uma alíquota do aduto purificado. Método descrito em Materiais e Métodos, item 3.3..77
- Figura 23.** Cromatogramas obtidos com detecção por UV em 260 nm de amostras de DNA injetadas no sistema de HPLC/UV/ESI-MS/MS descrito no item 3.6.....79
- Figura 24.** Cromatogramas obtidos com detecção por espectrometria de massas (MRM) de amostras de DNA injetadas no sistema de HPLC/UV/ESI-MS/MS descrito no item 3.6. Foram selecionadas as fragmentações m/z 408 $\rightarrow$ m/z 292, m/z 292 $\rightarrow$ m/z 246, m/z 410 $\rightarrow$ m/z 294. Para comparação do tempo de retenção é também apresentado o cromatograma do padrão do par de adutos..80

Figura 25. Alteração da massa da albumina em incubações com diferentes concentrações das soluções de *light-stick* amarelo e vermelho. Análise por MALDI/TOF/MS (item 3.7).....82

Figura 26. Fotografia da embalagem de *light stick* destacando a informação de que o produto não é tóxico.....84

Figura 27. Fotografia da embalagem de *light stick*. Informação fornecida pelo fabricante de que o produto não é tóxico... ..85

Figura 28. Análise da citotoxicidade de soluções de *light sticks* em células HepG2 utilizando o ensaio do corante cristal violeta. Valores expressos relativos ao controle (células HepG2, 100%). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicata. Solução recém: solução interna e externa homogeneizadas imediatamente antes do ensaio (ocorrida a reação quimioluminescente). Solução oxidada: conteúdo de bastão coletado na praia. Solução interna: contém 9,10-difenilantraceno (DPA), di-n-butil-ftalato e o éster de oxalato TCPO. Solução externa: contém H_2O_2 , dimetil-ftalato e salicilato de sódio. As concentrações utilizadas estão no intervalo 0,0125 – 0,12% por poço contendo 5×10^4 células. Os valores foram considerados significativos em relação ao controle pela análise do teste t: * refere-se a $p < 0,01$ e ** a $p < 0,05$86

Figura 29. Análise da citotoxicidade de soluções de *light sticks* em células HepG2 utilizando o ensaio do XTT. Valores expressos relativos ao controle (células HepG2, 100%). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicata. Solução recém: solução interna e externa homogeneizadas imediatamente antes do ensaio (ocorrida a reação quimioluminescente). Solução oxidada: conteúdo de bastão coletado na praia. Solução interna: contém 9,10-difenilantraceno (DPA), di-n-butil-ftalato e o éster de oxalato TCPO. Solução externa: contém H_2O_2 , n-metilftalato e salicilato de sódio. As concentrações utilizadas estão no intervalo 0,0125 – 0,12% por poço contendo 5×10^4 células. Os valores foram considerados significativos em relação ao controle pela análise do teste t, o asterisco indica $p < 0,01$88

Figura 30. Análise da citotoxicidade de soluções de *light stick* em células HepG2 utilizando o ensaio da enzima lactato desidrogenase (LDH), empregado para verificar a integridade da membrana plasmática. Valores expressos relativos ao controle positivo (células HepG2 + Triton X-100, 1%). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicata. Solução recém: solução interna e externa homogeneizadas imediatamente antes do ensaio (ocorrida a reação quimioluminescente). Solução oxidada: conteúdo de bastão coletado na praia. Solução interna: contém 9,10-difenilantraceno (DPA), di-n-butil-ftalato e o éster de oxalato TCPO. Solução externa: contém H_2O_2 , dimetil-ftalato e salicilato de sódio. As concentrações utilizadas estão no intervalo 0,0125% – 0,12% por poço contendo 5×10^4 células. Os valores foram considerados significativos em relação ao controle pela análise do teste t: * refere-se a $p < 0,01$ e ** a $p < 0,05$90

Figura 31. Níveis de 8-oxodGuo em células HepG2 controle e incubadas com soluções de LS nas concentrações de 0,003% e 0,006%. Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em triplicata. Solução recém:

solução interna e externa homogeneizadas imediatamente antes do ensaio (ocorrida a reação quimioluminescente). Solução oxidada: conteúdo de bastão coletado na praia. Solução interna: contém 9,10-difenilantraceno (DPA), di-n-butil-ftalato e o éster de oxalato (TCPO). Solução externa: contém H_2O_2 , dimetil-ftalato e salicilato de sódio. *p < 0,05 em relação ao controle (células + meio com soro).....93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Emissão da reação peróxi-oxalato com vários HPAs ativadores.....	28
Tabela 2. Diluições das soluções de <i>light stick</i> utilizadas nos ensaios de citotoxicidade com células HepG2.....	52
Tabela 3. Diluições das soluções de <i>light stick</i> utilizadas nas incubações com células HepG2 para extração de DNA e análise de 8-oxodGuo.....	55
Tabela 4. Substâncias utilizadas na reação quimioluminescente de <i>light sticks</i>	59
Tabela 5. Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do aduto dGuo-light stick em $\text{DMSO}-d_6^{a, b}$	78

LISTA DE SIGLAS

8-oxodGuo - 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
ATP – adenina trifosfato
CAT – catalase
CID – *collision induced dissociation* (dissociação induzida por colisão)
CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência
CVD – *Crystal Violet Dye* (corante cristal violeta)
DFOSA – desferroxamina
dGuo – 2' desoxiguanosina
DMSO - dimetil sulfóxido-d6
DNA – desoxirribose nucleotídeo adenina
DPA - 9,10-difenil antraceno
ERNs - espécies reativas de nitrogênio
EROs - Espécies reativas de oxigênio
ESI- *electrospray ionization* (ionização por eletrospray)
GPx - glutathione peroxidase
GR - glutathione redutase
HPA – hidrocarboneto policíclico aromático
HPLC – *high performance liquid chromatography*
IT- *ion trap* (aprisionamento de ions)
 λ - comprimento de onda
LDH - enzima lactato desidrogenase
LPO – peroxidação lipídica
[M + H]⁺ - íon molecular protonado
m/z – razão massa carga
MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*
MDA – malonaldeído
MRM – monitoramento de reação múltipla
MS – *mass spectrometry* (espectrometria de massas)
MS1 – primeiro analisador por espectrometria de massas
MS2 – segundo analisador por espectrometria de massas
NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo

NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada

OD - *Optical Density*

PBS - tampão salina fosfato

PDA – *photodiode array* (arranjo fotodiodo)

PDE – *phosphodiesterase*

pH – potencial hidrogenionico

RMN – ressonância magnética nuclear

SOD - superóxido dismutase

TCPO - Bis[2,4,6-triclorofenil]-oxalato

TIC – corrente iônica total

TOF – *time-of-flight* (tempo de voo)

UV – *ultraviolet*

XTT - sal tetrazólio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Light Sticks	21
1.1.1 Química dos Light Sticks	21
1.1.2 Usos	23
1.2 Mecanismos de toxicidade	24
1.2.1 Revisão da literatura sobre a toxicidade dos constituintes das soluções de light stick	25
1.2.1.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	26
1.2.1.1.1 HPAs e biotransformação	28
1.2.1.2 Toxicidade de Ésteres do Ácido Ftálico (ftalatos)	30
1.2.1.3 Toxicidade do Peróxido de Hidrogênio	31
1.2.1.4 Toxicidade dos Triclorossalicilatos e outros Policlorofenóis (produtos gerados na reação de quimioluminescência)	32
1.3 Radicais livres, estresse oxidativo e lesões em DNA	34
1.3.1 Radicais livres e estresse oxidativo	34
1.3.1.1 Peroxidação lipídica	37
1.3.1.2 Biomarcadores de estresse oxidativo	38
1.3.2 Lesões em DNA	40
1.4 Citotoxicidade	40
2 OBJETIVOS	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 Reagentes	44
3.2 Equipamentos	44
3.2.1 Análises por HPLC/PDA e HPLC-ESI-MS/MS	45
3.2.2 Análises por MALDI/TOF/MS	46
3.3 Incubações de dGuo com soluções de light stick	46
3.4 Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	48
3.5 Espectros de Massas (ESI/MS)	48
3.6 Análise da formação do aduto em DNA incubado com solução de light stick <i>in vitro</i>	48
3.7 Incubações de albumina com soluções de light stick e análise da massa da albumina por MALDI/TOF/MS	49

3.8 Soluções de <i>light stick</i> utilizadas nas incubações com células	50
3.9 Cultivo e expansão celular	51
3.10 Descrição das incubações para os ensaios de citotoxicidade e análise de 8-oxodGuo	51
3.10.1 Ensaios de citotoxicidade	52
3.10.1.1 Corante cristal violeta (CVD)	53
3.10.1.2 Sal de tetrazólio (XTT).....	53
3.10.1.3 Lactato desidrogenase (LDH).....	54
3.10.2 Incubações de células HepG2 com soluções de light stick para extração de DNA e análise de 8-oxodGuo.....	54
3.10.2.1 Extração do DNA.....	55
3.10.2.2 Hidrólise enzimática do DNA.....	56
3.10.2.3 Análise de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina	56
3.11. Análise estatística	57
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1 Caracterização Química das Soluções de Light Stick	58
4.2 Avaliação da reatividade das soluções de light sticks com biomoléculas <i>in vitro</i>	70
4.2.1 Formação de aduto com 2'-desoxiguanosina.....	70
4.2.2 Reação com albumina.....	81
4.3 Avaliação de efeitos em células em cultura.....	83
4.3.1 Avaliação da Citotoxicidade das Soluções de Light Stick	84
4.3.2 Avaliação do Dano Oxidativo em Células Incubadas com Soluções de Light Stick	91
5 CONCLUSÃO	95
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
APÊNDICE	

1 INTRODUÇÃO

O extraordinário crescimento da população mundial contribuiu para o uso e o consumo de bens e produtos não renováveis, ocasionando o aumento e acúmulo de lixo. Atualmente, o descarte de lixo em locais impróprios tem contribuído para a poluição do meio ambiente.

Em 2009 foram descobertos nos Portos de Santos e do Rio Grande, e em uma estação alfandegária de Caxias do Sul, 89 contêineres contendo lixo da Inglaterra. A esses eventos, inclui-se o lixo descartado no mar por barcos e navios, ou que chega a ele trazido por rios e enxurradas, sendo hoje um problema preocupante. Os centros de recepção de visitantes do Programa Brasileiro de Conservação das Tartarugas Marinhas (Projeto Tamar) exibem painéis sobre a variedade e a periculosidade do lixo coletado nas praias ou extraído das vísceras de tartarugas doentes ou mortas (BECHARA *et al.*, 2009).

Ressalte-se que a maioria dos resíduos lançados ao mar vem de fontes terrestres. Para a manutenção da fauna marinha e preservação das praias, coletas sistemáticas de lixo marinho vêm sendo realizadas em praias brasileiras, com apoio financeiro e logístico de organizações não-governamentais (ONGs).

A incidência de lixo de origem estrangeira na Costa dos Coqueiros, região a 60 quilômetros da cidade de Salvador (BA), foi observada pela primeira vez em fevereiro de 2001. Em coletas sistemáticas dentro de um período de quatro anos, todos os tipos de lixo estrangeiro encontrado na praia foram catalogados em relação ao seu tipo e país de origem. O plástico foi o principal tipo de material encontrado (SANTOS *et al.*, 2005). Dentre esses materiais plásticos incluem-se os sinalizadores luminosos.

Sinalizadores luminosos, atratores luminosos, *glow-sticks* ou mais conhecidos em inglês por *light sticks* (LS), são bastões de plástico transparente que contêm soluções responsáveis pela emissão de luz fluorescente. A grande produção industrial desses sinalizadores luminosos está destinada à indústria da pesca. Companhias pesqueiras os utilizam por meio da técnica conhecida como espinhel de superfície, na qual os sinalizadores são presos a uma linha de pesca de 80 quilômetros de comprimento onde são fixados também os anzóis, resultando em atração dos peixes pela luminosidade emitida e a otimização da pesca.

A ONG Global Garbage, através de seus membros, recolheu em algumas campanhas realizadas, cerca de 7 mil sinalizadores luminosos em 90 quilômetros de praia do litoral norte da Bahia. Há informações de localidades praieiras do Maranhão, de Santa Catarina e do Espírito Santo quanto aos sinalizadores aparecerem constantemente nas areias. Os agentes dessa ONG constataram o uso dos conteúdos de sinalizadores luminosos por moradores locais (BECHARA *et al.*, 2009).

Assim, o descarte indevido no mar ou na praia desses objetos representa um perigo ambiental e risco à saúde humana. O uso inadvertido dos conteúdos desses bastões coletados por moradores do litoral brasileiro foi constatado e precisa ser esclarecido. Devido alguns dos constituintes serem compostos com evidências de efeitos tóxicos, é importante a análise da toxicidade das soluções de LS e a investigação dos mecanismos pelos quais tal mistura pode ser tóxica a humanos. Portanto, nós iniciamos com este estudo a avaliação da toxicidade a nível celular e molecular dos conteúdos de LS.

1.1 Light Sticks

1.1.1 Química dos Light Sticks

A química dos vaga-lumes, responsável pela emissão de luz visível, inspirou vários pesquisadores a estudarem e descreverem várias reações análogas, chamadas quimioluminescentes (“químio-energizadas”), em que a energia química dos reagentes é convertida em luz com rendimentos muito altos (NERY e BAADER, 2001).

LS consistem de tubos de poliestireno transparentes que contêm duas soluções compartimentalizadas: (1) um éster oxálico ou cloreto de oxalila em dibutil ftalato, e um hidrocarboneto policíclico aromático em uma pequena ampola de vidro, a qual classificamos neste trabalho como **solução interna** e (2) peróxido de hidrogênio em dimetil-ftalato ou dibutil-ftalato, com salicilato dentro de um tubo plástico, classificado como **solução externa**. Quando o tubo plástico é dobrado, a ampola interna de vidro se rompe, iniciando a interação entre as soluções, ocorrendo a reação de quimiolumiscência (figuras 1 e 2) (Ivar do Sul *et al.*, 2005; Cyalume®).

Um dos mecanismos da reação de quimioluminescência em meio líquido, classificado como sistema peróxi-oxalato, foi descrito por Rauhut em 1969 e é a base de produtos comerciais chamados *light sticks* (LS) (marca registrada Cyalume). O sistema peróxi-oxalato é proposto para a geração de estados eletronicamente excitados, denominado CIEEL (“Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence”, ou seja, Luminescência Quimicamente Iniciada por Intercâmbio de Elétron). Em resumo, a sequência mostrada na figura 1 é iniciada pela oxidação do éster de oxalato ou do cloreto de oxalila (a) por H_2O_2 , gerando um intermediário com alto conteúdo energético, o peróxido cíclico 1,2-dioxetanodiona (b), que forma um complexo com um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA, ativador) e transfere energia para este, de forma a ser gerado um fluoróforo no estado eletronicamente excitado HPA^* que emite luz fluorescente (c) e volta ao seu estado fundamental (d) (NERY e BAADER, 2001; ALBERTIN, *et al.*, 1998).

Figura 1. Reação de quimioluminescência indireta do sistema peróxi-oxalato, ocorrida nos bastões de *light sticks*. Reação iniciada pela oxidação do bis-(triclorofenil)oxalato (TCPO) (a) pelo H_2O_2 , formando um oxalato intermediário, 1,2-dioxetanodiona (b) que complexa-se com o ativador (HPA) e transfere energia a este (c) e é responsável pela emissão de luz, voltando ao estado fundamental (d).

Figura 2. Bastões de *light sticks*:

a) bastão íntegro; b) flexão do plástico para rompimento da ampola interna; c) mistura das soluções e início da emissão de luz e d) bastão sem quimioluminescência.

1.1.2 USOS

Por ser uma fonte portátil e prática de “luz fria”, de fácil obtenção comercial, os LS possuem variados empregos, sendo que em todos a finalidade é a mesma, obtenção de luz. LS são utilizados por mergulhadores adaptados à roupa, estão presentes em kits de emergência da aviação civil, coletes salva-vidas, enfeite na decoração de festas, em danceterias como acessório pessoal (pulseira e colar), e em locais sem luz elétrica, por exemplo, acampamentos, etc (Bechara *et al.*, 2009; Iva do Sul, *et al.*, 2009). Apesar da diversidade de usos, o emprego mais frequente desses sinalizadores luminosos está destinado à pesca de espinhel pelágico, técnica descrita anteriormente.

O contato humano a esses conteúdos inicia-se quando os bastões plásticos são rompidos e as substâncias entram em contato com tecidos e mucosas. Quando o contato não é acidental, o uso recebe variadas finalidades, tais como: repelentes para insetos, óleos bronzeadores e massageadores, óleos para os cabelos, medicamentos contra dores e feridas, tratamento de vitiligo, limpeza de piche na pele, lubrificantes de utensílios domésticos, combustíveis de lamparinas, formicidas e outros não recomendados pelos fabricantes (Ivar do Sul, 2005). Há também o uso por frequentadores de festas para que a pele fique “iluminada”.

1.2 MECANISMOS DE TOXICIDADE

Os mecanismos de toxicidade de uma substância implicam em uma série de eventos que se iniciam com a exposição e compreendem múltiplas interações entre o xenobiótico e o organismo. Dependendo primariamente do grau e da via de exposição esses xenobióticos podem contrariamente afetar a função e/ou estrutura de organismos vivos, culminando com o efeito tóxico. As vias de exposição humana aos LS são cutânea e oral/digestiva.

A compreensão dos mecanismos de toxicidade de uma substância tem importantes implicações que transcendem o mero conhecimento do efeito tóxico. Ao se compreender os mecanismos pelos quais uma substância exerce seus efeitos tóxicos podem-se desenvolver meios para intervir no processo de toxicidade e detectar e quantificar alterações celulares relacionadas à exposição antes que o efeito tóxico seja observado (OGA, 2005).

Estudos sobre a toxicidade de LS em humanos são escassos. Na literatura as poucas referências são sobre o potencial tóxico para organismos marinhos e animais de laboratório, sob condições experimentais. Entretanto, alguns efeitos tóxicos dos seus constituintes isolados estão bem descritos, o que corrobora com as informações encontradas por nosso grupo em estudos *in vitro* com conteúdos de bastões de LS (mistura) recolhidos em praias e soluções de bastões antes da ocorrência da reação de quimioluminescência.

Hoffman e colaboradores (2002), relataram um estudo em crianças e adultos de Nova York que foram atendidos no Centro de Controle de Intoxicação. Entre os 118 casos de exposição, 108 foram de indivíduos que ingeriram o conteúdo desses

bastões, 9 foram por exposição ocular e 1 por exposição cutânea. Somente os pacientes expostos ao conteúdo extravasado da embalagem de LS relataram sintomas (n=27). Os sintomas foram restritos a irritação transitória no local da exposição, e nenhuma ocorrência sistêmica de toxicidade. Todos os adultos (n=4) romperam inadvertidamente ou engoliram LS intacto em danceterias ou festas. Os autores concluíram que não houve morbidade significativa ou mortalidade (Hoffman *et al.*, 2002).

Em outro estudo, os autores realizaram alguns testes, como o teste tópico de dermatotoxicidade (irritação epicutânea) do conteúdo de sinalizadores luminosos na região dorsal de ratos Wistar, seguido de exposição à radiação UVA e UVB e à aplicação de água do mar. Resultados apontaram edemas (inchaço) e eritemas leves e moderados, além de formação de bolhas nos grupos tratados com a solução de *light stick*. Em análises histopatológicas foi diagnosticada hiperqueratose, espessamento da epiderme e infiltrado inflamatório na região da derme reticular, com alterações acentuadas pela incidência de radiação. Essas alterações observadas são similares às comumente encontradas em lesões de pele causadas pela luz solar em humanos, e podem evoluir para um carcinoma de células escamosas, que é uma das formas mais frequentes de câncer de pele (Ivar do Sul *et al.*, 2009).

1.2.1 REVISÃO DA LITERATURA SOBRE A TOXICIDADE DOS CONSTITUINTES DAS SOLUÇÕES DE *LIGHT STICK*

O elevado número de substâncias e a multiplicidade das estruturas biológicas envolvidas, assim como os numerosos processos de transformação possíveis, desencadeiam muitos efeitos tóxicos. As propriedades químicas de cada substância presente em uma mistura são de grande relevância quando se deseja analisar a toxicidade. Devido ao LS ser uma mistura de substâncias, a toxicidade de cada uma deve ser considerado.

1.2.1.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem um grupo caracterizado por sua estabilidade química, elevado ponto de fusão e ebulição, e baixa solubilidade em água com tendência a diminuir conforme aumenta a massa molecular. HPAs possuem dois ou mais anéis aromáticos condensados em sua estrutura. São formados durante a combustão incompleta de materiais orgânicos (Straif *et al.*, 2005).

Existem muitas pesquisas a respeito da poluição ambiental por HPAs, devido à sua carcinogenicidade em animais de laboratório e provável carcinogenicidade em humanos (Godschalk *et al.*, 2003).

A carcinogenicidade e mutagenicidade dos diferentes HPAs, cerca de 100, é significativa para aqueles que possuem mais de quatro anéis aromáticos fundidos. A Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA USA, sigla em inglês) e a Comunidade Européia priorizam o monitoramento de 16 HPAs, enquanto o Instituto Nacional de Saúde e Segurança Ocupacional, também dos EUA – NIOSH prioriza dezessete HPAs para investigação. O composto adicional na lista NIOSH é o benzo[*e*]pireno (Cristale *et al.*, 2008). São eles: fluoreno, benzo[*a*]antraceno, naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, criseno, benzo[*g,h,i*]perileno, fenantreno, antraceno, pireno, benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, dibenzo[*a,h*]antraceno e indeno[1,2,3-*cd*]pireno (figura 3) (Franco *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2006).

HPAs são encontrados na água, solo, alimentos e ar atmosférico contaminados. Na água, os HPAs estão presentes principalmente pelo vazamento de combustível das embarcações ou plataformas petrolíferas. No solo, devido à implantação de aterros sanitários. Em alimentos, pelo uso da água contaminada e também pela sedimentação sobre os grãos e, em maior escala, por processos de preparo (cozimento, torrefação, preparo de grelhados, etc). A poluição do ar pode ser originada pela combustão incompleta por fontes naturais como incêndios florestais que ocorrem espontaneamente e erupções vulcânicas, e por fontes de origem antropogênica, por exemplo: 1) combustíveis fósseis como diesel e gasolina; 2) fumaça de cigarro; 3) sistema de aquecimento artesanal (chaminés) e 4) exaustão de resíduos industriais. A presença em fumaças e poeiras do ar, fonte de contaminação mais descrita, é a principal forma de entrada no organismo humano,

através das vias oral e respiratória. Podem ser absorvidos pela pele e mucosas, sendo rapidamente distribuídos pelo organismo (Cristale *et al.*, 2008; Netto *et al.*, 2000, Straif *et al.*, 2005).

Muitas pesquisas ambientais e ocupacionais relacionam a indução de estresse oxidativo pela exposição aos HPAs, devido à produção de espécies reativas de oxigênio no processo de biotransformação dessas substâncias (Costa *et al.*, 2006).

Figura 3. Estruturas dos 16 principais HPAs citados na literatura.

Esses compostos presentes na solução de LS atuam simultaneamente como catalisadores e emissores fluorescentes, cuja cor pode ser escolhida à vontade. A emissão intensa em diferentes cores depende do ativador utilizado, ou seja, do HPA (Albertin *et al.*, 1998). Alguns são descritos na Tabela 1 com a cor emitida, a intensidade, e a duração da emissão.

Tabela 1. Emissão da reação peróxi-oxalato com vários HPAs ativadores

<i>HPA</i>	<i>Cor emitida</i>	<i>Intensidade da luz</i>	<i>Duração da emissão</i>
9,10-difenilantraceno (DPA)	azul	Alta	média
1,3-difenilisobenzofurano (DFB)	verde	Alta	curta
9,10-bis(difeniletinil)antraceno (BFA)	verde	Alta	longa
5,6,11,12-tetrafenilnaftaceno (Rubreno)	amarela	muito alta	curta
DPA e DFB	azul celeste	muito alta	média
Mistura (todos ativadores)	branca	muito alta	longa

Retirado de Albertin *et al.*, 1998.

1.2.1.1.1 HPAs E BIOTRANSFORMAÇÃO

O metabolismo dos HPAs tem papel importante na transformação para as formas mais solúveis necessárias para excreção. O composto submetido à biotransformação hepática é geralmente oxidado por enzimas de fase I através de reações catalisadas por monooxigenases do citocromo P450. Esses metabólitos de fase I são conjugados a glutathione, sulfatos, ou ácido glicurônico para metabólitos de fase II, geralmente uma forma mais polar e solúvel em água que a substância inicial, facilitando assim a excreção. Os metabólitos e conjugados formados são excretados pela urina ou fezes. Porém, conjugados excretados pela bile podem ser reabsorvidos no intestino. Metabólitos resultantes de oxidação podem ser usados como biomarcadores para indicar a dose interna recebida. A maioria dessas reações resulta em detoxificação. Entretanto, compostos eletrofílicos podem ser gerados no processo de biotransformação, sendo altamente reativos e tendo a possibilidade de interagir de forma covalente com proteínas e ácidos nucleicos, resultando em adutos. Esses adutos formados podem comprometer a função da célula normal,

desencadeando uma série de efeitos nocivos, o que será detalhado adiante (Franco *et al.*, 2008). Além disso, espécies reativas de oxigênio são formadas no processo de biotransformação dessas substâncias, havendo adicionalmente a possibilidade de indução de dano oxidativo (Park *et al.*, 2006).

Em um encontro entre 24 cientistas de nove países, no qual foi discutido o potencial carcinogênico de 60 HPAs e seus diferentes mecanismos de ação, foi debatida a formação de adutos de HPA-DNA estáveis e instáveis, levando principalmente a transversões de G para T frequentemente encontradas em protooncogenes e genes supressores de tumor mutados. Muitos diolépidos de HPAs são carcinogênicos em animais. Na conclusão do trabalho foi definido que a exposição à mistura de HPAs em indústrias contribui para aumentar o risco de incidência de câncer, mas não define o papel individual dos HPAs (Straif *et al.*, 2005).

Muitos HPAs, como já relatado, são mutagênicos em bactérias e células humanas, carcinogênicos em animais experimentais e, portanto, suspeitos de terem um papel na etiologia de muitos cânceres humanos (Bigger *et al.*, 2000). Estudos epidemiológicos associam a exposição aos HPAs com aumento na incidência de câncer de pulmão, pele, bexiga e próstata (Boffetta *et al.*, 1997). Estudos utilizando biomarcadores de exposição e de efeito biológico forneceram evidências dos efeitos genotóxicos dos HPAs presentes na atmosfera em condições de intensa poluição. O risco aumentado de dano (adutos HPA-DNA) foi observado em populações ocupacionalmente expostas aos HPAs gerados por fontes industriais ou urbanas, bem como fumaça de cigarro (Sram e Binkova, 2000; estudos revisados por Okona-Mensah *et al.*, 2005). Devido à seletividade de reação desses compostos com determinados sítios do genoma, o espectro de mutações induzidas por HPAs no gene supressor de tumor *p53* em células epiteliais bronquiais se assemelha aos observados em cânceres pulmonares humanos, reforçando a ideia de que a exposição aos HPAs se relaciona com o desenvolvimento de câncer pulmonar (estudos revisados por Singh e Farmer, 2006). Determinações da natureza, quantidade e localização das lesões no DNA podem ser de importância para avaliações de risco de desenvolvimento de câncer. De modo geral, tais substâncias não exercem seus efeitos genotóxicos diretamente, mas necessitam de ativação metabólica para intermediários eletrofílicos reativos que, então, levam a lesões no DNA e outras biomoléculas.

1.2.1.2 Toxicidade de Ésteres do Ácido Ftálico (ftalatos)

Ftalatos são utilizados como solventes na formulação de *light sticks* e têm a função de aumentar a eficiência da quimioluminescência, pois possuem viscosidade considerável para otimizar a reação. Na indústria são primariamente utilizados como plastificantes em produtos flexíveis classificados como cloreto de polivinila (PVC), compondo produtos como equipamentos médicos, brinquedos, sacos plásticos, detergentes, óleos lubrificantes, solventes, tintas, formulações farmacêuticas e cosméticas (Koo e Lee, 2005).

Os ftalatos mais frequentemente utilizados são: di-(2-etilhexil)-ftalato (DEHP); dietil-ftalato (DEP); di-n-butil-ftalato (DBP); butilbenzil-ftalato (BBP); di-n-heptil-ftalato (DNHP); monoetilhexol-ftalato (MEHP).

Di-(2-etil-hexil)-ftalato (DEHP) é amplamente utilizado em vários tipos de produtos plásticos, incluindo pisos de vinil, tintas, brinquedos e sacos plásticos, e di-n-butil-ftalato (DBP) é comum em produtos cosméticos, como perfumes e shampoo.

Humanos podem ser expostos a ftalatos através de alimentos, ar e em produtos de consumo, pelas vias oral, respiratória, cutânea e intravenosa. Após absorção, os ftalatos são rapidamente metabolizados aos seus respectivos monoésteres hidrolíticos. Para alguns ftalatos, os monoésteres podem ser mais metabolizados aos seus produtos oxidados antes da excreção na urina ou fezes sob a forma livre ou conjugada. Estes metabólitos têm sido usados como biomarcadores de exposição a ftalatos. Representam uma importante classe de substâncias desreguladoras endócrinas (EDCs), sendo considerados agentes promotores nos processos de toxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, imunogenicidade e neurotoxicidade (Koo e Lee, 2005). São apontados como causadores de efeitos hepatotóxicos e danos reprodutivos (testículo e útero) em animais de laboratório. Lesões em DNA de espermatozóides humanos (fragmentação) foram associadas com a exposição a ftalatos.

Atualmente, a exposição aos ftalatos tem sido avaliada por análise de metabólitos em fluidos biológicos, como urina e soro (Latini, 2005). Análises quantitativas sensíveis permitiram a detecção de nove metabólitos de ftalatos em soro humano. Tais metabólitos indicam a exposição dos indivíduos aos ftalatos e podem ser correlacionados aos efeitos tóxicos observados (Kato *et al.*, 2003).

Em um estudo com 150 mulheres com idade média de 43 anos e 150 crianças com idade média 12 anos, DBP e MEHP estiveram presentes em altos níveis nas mulheres. Mais de 95% das mulheres e crianças analisadas tiveram resultado positivo para DEHP e DBP em urina, e mais de 74% estiveram abaixo dos limites de detecção analítica para BBP e DEP. Níveis urinários de MEHP em mulheres foram significativamente superiores que em crianças (Koo e Lee, 2005).

Ratos expostos por todo o período de vida ao di-(2-etilhexil)-ftalato desenvolveram tumores no pulmão. Em outro estudo, células da mucosa bucal humana incubadas com ftalatos *in vitro* sofreram fragmentação do DNA (Kleinsasser *et al.*, 2000).

O Centro do Programa Nacional de Toxicologia para a Avaliação da Reprodução Humana dos Estados Unidos (NTP-CERHR) concluiu que os ftalatos são tóxicos para o sistema reprodutor de humanos e que os primatas podem ser menos sensíveis que os roedores para certos ftalatos (Bechara *et al.*, 2009).

1.2.1.3 Toxicidade do Peróxido de Hidrogênio

No sistema peróxi-oxalato, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) reage com o éster oxálico ou o cloreto de oxalila, formando, em várias etapas, um peróxido cíclico. Dependendo da escolha do derivado de oxalato anteriormente citado, pode-se usar H_2O_2 anidro ou aquoso para evitar a hidrólise do éster oxálico (Albertin *et al.*, 1998).

Peróxido de hidrogênio pode formar-se nas células devido à redução incompleta do oxigênio a água. A toxicidade deve-se à facilidade com que ele origina radicais hidroxila ($\cdot OH$), que são oxidantes muito fortes capazes de lesar os constituintes celulares. H_2O_2 pode ser removido por enzimas peroxidases em um processo que envolve a redução à água (Augusto, 2006).

O H_2O_2 é produzido endogenamente pela respiração celular em condições normais, durante o transporte de elétrons na mitocôndria, e em outras atividades enzimáticas. O "vazamento" de elétrons reduz parcialmente o oxigênio para produzir ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$). A dismutação subsequente de $O_2^{\cdot -}$ gera H_2O_2 , que na presença de metais de transição produz $\cdot OH$ altamente reativos. Esses radicais

podem danificar, por exemplo, o DNA, levando a oxidação de bases, formação de sítios abásicos e quebras de fita (Horváthová *et al.*, 2009; Miyamoto *et al.*, 2007).

H₂O₂ tem demonstrado ação como um importante mensageiro intracelular, particularmente no mecanismo apoptótico. Quando em altas concentrações, inicia um processo nocivo incluindo envelhecimento, morte celular e mutagênese. Em amostras de *light sticks* descartados em praias foram encontrados apenas traços de peróxido de hidrogênio. A reação de quimioluminescência consome totalmente este reagente, e o peróxido rapidamente se decompõe em água e oxigênio quando exposto à luz solar.

1.2.1.4 Toxicidade dos Triclorossalilatos e outros Policlorofenóis (produtos gerados na reação de quimioluminescência)

O éster oxálico presente na solução de LS pode ser o bis(2,4,5-triclorofenil-6-carbopentoxifenil)-oxalato (CPPO) ou bis(2,4,6-triclorofenil)-oxalato (TCPO), ambos estão disponíveis comercialmente podendo também ser preparados em laboratório. A função dos ésteres fenólicos do ácido oxálico, ou somente ésteres de oxalato, é auxiliar a catálise da reação, ou seja, otimizar o rendimento quântico. Produtos da reação são dióxido de carbono, clorossalilatos, como o 2,4,5-triclorossalilato, e etileno glicol monoetil éter. Salicilato de sódio também pode ser utilizado como um catalisador (razão pela qual indivíduos utilizam a mistura como analgésico) (Bechara *et al.*, 2009).

Os ésteres salicílicos podem ser convertidos no nosso organismo em ácido salicílico, via ação de enzimas chamadas de esterases. É o que ocorre com o ácido acetilsalicílico (AAS), princípio ativo da aspirina, que possui efeitos antitérmico, antiinflamatório, analgésico e antitrombótico. No caso dos *light sticks*, no entanto, o ácido salicílico gerado está normalmente clorado, o que pode alterar o seu mecanismo de ação e os efeitos à saúde. Não há dados na literatura sobre mecanismos de ação de clorossalilatos como os gerados nas reações quimioluminescentes de *light sticks* (Bechara *et al.*, 2009).

Por outro lado, esses mesmos ésteres de ácido clorossalicílico poderiam explicar a ação formicida também observada popularmente para os *light sticks*, uma vez que suas estruturas se assemelham às de inseticidas organoclorados, tais como benzenos e ciclohexanos clorados (um representante da classe é o lindano, também

conhecido como BHC). De modo geral, esses compostos são de difícil degradação e acabam se acumulando no meio ambiente e nos organismos com os quais entram em contato. Muitos representantes da classe dos organoclorados aromáticos interferem na ação natural dos hormônios nos organismos, podendo causar problemas reprodutivos e levar ao desenvolvimento de câncer. Estão também envolvidos na indução de um tipo de lesão da pele conhecido como cloracne, que se caracteriza pelo desenvolvimento de cistos de coloração escura, resultantes da queratinização de glândulas sebáceas. Indivíduos expostos cronicamente a altas concentrações de organoclorados aromáticos podem, ainda, desenvolver uma doença conhecida como porfiria, na qual há o distúrbio da biossíntese do grupo heme, um importante constituinte de diversas proteínas do nosso organismo, como hemoglobina, mioglobina, citocromos, catalases, peroxidases. Nessa doença, alguns precursores do heme se acumulam em diversos tecidos do corpo, incluindo a pele. Tais moléculas podem ser excitadas pela luz no comprimento de onda de 400 – 410 nm e transferir essa energia para a molécula de oxigênio, levando à geração de espécies reativas de oxigênio que danificam a pele através de um processo chamado ação fotodinâmica. Esses indivíduos se tornam então mais sensíveis aos efeitos da radiação solar e suas partes expostas à luz, como mãos e faces, ficam ulceradas (Bechara *et al.*, 2009).

Policlorofenóis são estruturalmente muito semelhantes ao ácido clorossalicílico e estudos mostram que se acumulam em humanos e outros organismos aquáticos e terrestres. Um importante representante da classe é o pentaclorofenol (PCP), que já foi muito utilizado como herbicida, biocida e para preservar madeira. Seu uso e de outros policlorofenóis é proibido em vários países, como Alemanha, Taiwan e China. O número e posição dos átomos de cloro são alguns dos fatores importantes para a toxicidade desses compostos, sendo que genotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade e desordens neurodegenerativas já foram descritas. Herbicidas fenoxiacéticos, como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), constituem um outro grupo de compostos com estruturas relacionadas às dos clorossalicilatos dos *light sticks*. Estudos apontam o 2,4-D como genotóxico, mutagênico, neurotóxico, supressor do sistema imune e hepatotóxico. Smith e colaboradores (1984) já haviam observado a indução de sarcoma em indivíduos expostos a herbicidas fenoxiacéticos e clorofenóis (Bechara *et al.*, 2009).

1.3 RADICAIS LIVRES, ESTRESSE OXIDATIVO E LESÕES EM DNA

1.3.1 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

A respiração é um processo fisiológico indispensável à manutenção da vida de seres aeróbicos, pois é ela que concede o aporte de oxigênio (O_2) necessário para a formação de ATP, a “fonte” de energia utilizada por nosso organismo. Todavia, o metabolismo do oxigênio também gera uma série de subprodutos reativos e potencialmente tóxicos, conhecidos como espécies reativas de oxigênio e radicais livres. Estima-se que entre 2 a 5% do oxigênio utilizado pela mitocôndria seja convertido a espécies reativas de oxigênio (EROs) (Augusto, 2006).

O termo radical livre refere-se ao átomo ou molécula que contém um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. A presença de um ou mais elétrons não pareados determina uma atração para um campo magnético e, algumas vezes, torna a substância altamente reativa (Vannucchi *et al.*, 1998).

Os radicais livres participam de reações de óxido-redução, ou seja, cedem um elétron desemparelhado, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se (Ferreira e Matsubara, 1997). Entretanto, radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada (Augusto, 2006). Dessa forma, o termo espécies reativas de oxigênio (EROs) é mais adequado. Espécies reativas podem também ser derivadas do metabolismo do nitrogênio, sendo chamadas espécies reativas de nitrogênio (ERNs), podem ser produzidas em reações enzimáticas envolvidas no metabolismo de vários compostos (ações de oxidases, oxigenases, mono-oxigenases, tais como D-aminoácido oxidase, xantina oxidase, CYP450, tirosina hidroxilase, etc), na explosão respiratória em neutrófilos e macrófagos, e em reações de oxidação química direta ou catalisada por metais de transição (Augusto, 2006).

No processo da respiração, o O_2 sob condições fisiológicas sofre uma redução tetravalente, com recepção de 4 elétrons, que resulta na formação de H_2O (figura 4). Durante esse processo podem ser formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroperoxila ($HO_2^{\bullet}$), hidroxila ($^{\bullet}OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Embora o excesso de EROs possa ser mediador de doenças como aterosclerose, câncer e doenças neurodegenerativas, sua constante formação

nos organismos aeróbicos é de grande importância para a manutenção das funções celulares normais, uma vez que atuam em vias de sinalização intra-celulares controlando a expressão de diversos genes, além de serem muito importantes no combate a microorganismos invasores (Ferreira e Matsubara, 1997; Armstrong, 2002).

Figura 4. Redução tetraivalente do oxigênio molecular até a formação de água. Várias EROs são formadas no processo. Retirado de Ferreira e Matsubara, 1997.

Desde quando os organismos passaram a usar o O_2 para a respiração, desenvolveram-se os sistemas antioxidantes, que podem ser definidos como moléculas que inibem o processo de oxidação, ou que, quando presentes em baixas concentrações, comparadas à do substrato oxidável, diminuem ou inibem significativamente a oxidação daquele substrato (Oga *et al.*, 2008; Souza, 2005). Este sistema de defesa antioxidante pode ser classificado em dois mecanismos distintos: enzimático e não enzimático. No sistema enzimático as enzimas envolvidas são a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR), peroxirredoxinas, tioredoxinas e catalase (CAT). No sistema não enzimático

atuam as vitaminas A, C e E (retinol, ascorbato e tocoferol, respectivamente), glutathiona, carotenóides, ubiquinol, melatonina, bilirrubina, α -ceto ácidos, ácido lipóico, ácido úrico e quelantes de metais (Oga *et al.*, 2008; Jos *et al.*, 2005; Yakovleva *et al.*, 2004; Augusto, 2006).

Em situações em que ocorre diminuição da atuação do sistema antioxidante ou aumento da formação das espécies reativas poderá ocorrer o estresse oxidativo. Este caracteriza-se quando há um desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e de pró-oxidantes, com o predomínio destes últimos (Figura 5) (Sicińska *et al.*, 2006; Halliwell e Gutteridge 1999; Goetz e Luch, 2008).

O efeito deletério do estresse oxidativo varia consideravelmente entre as espécies, e de acordo com a idade, estado fisiológico, patológico e nutricional. Desencadeia alterações funcionais e injúria das funções vitais, em diversos tecidos e órgãos, dentre eles músculos, fígado, cérebro, tecido adiposo e endotelial (Dröge, 2002; Quiroga, 1992; Goldfarb, 1993; Duart *et al.*, 1993; Fenster *et al.*, 1999; Signorini e Signorini, 1993; Keynes e Garthwaite, 2004).

Em 1985 já se sabia que o aumento da produção de EROs ocasionava oxidação de lipídios, proteínas e DNA. Como consequência, prejudicava a função fisiológica, mas não havia métodos eficazes para avaliação do estresse oxidativo. A partir de então teve início a busca por biomarcadores de estresse oxidativo. A correlação dos níveis desses biomarcadores com sinais clínicos pode levar a um diagnóstico de estresse oxidativo.

Figura 5. Estresse oxidativo: desequilíbrio entre antioxidantes e espécies reativas de oxigênio (EROs).

1.3.1.1 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Membranas celulares são alvos para ataques de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Radicais muito reativos, como radical hidroxila, são capazes de abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo bis-alílico metileno presente em lipídios poliinsaturados, iniciando assim uma reação em cadeia conhecida como peroxidação lipídica (LPO). Durante esse processo, lipídeos de membrana são oxidados a hidroperóxidos (LOOH). LOOH são também gerados por oxigênio molecular singlete ($^1\text{O}_2$) e pela ação de enzimas tais como lipoxigenases e cicloxigenases (Miyamoto *et al.*, 2007).

O processo de LPO se divide em três etapas principais: iniciação, propagação e terminação. A reação inicia-se com a oxidação do ácido graxo poliinsaturado (LH). Tal oxidação pode ser realizada pelo $\bullet\text{OH}$, radical carbonato ou pelo $\text{LO}\bullet$ (radical alcóxila), com consequente formação do $\text{L}\bullet$ (radical lipídico) e H_2O (Figura 6) (Ferreira e Matsubara, 1997).

Figura 6. Reações envolvidas no processo de peroxidação lipídica modificado de Ferreira e Matsubara, 1997.

A etapa de propagação ocorre devido à reação do radical $\text{L}\bullet$ com o O_2 , levando à formação do $\text{LOO}\bullet$ (radical peroxila), que pode interagir com uma nova molécula de ácido graxo gerando mais um radical $\text{L}\bullet$. A decomposição do hidroperóxido lipídico (LOOH) pode ser catalisada por metais de transição, como

cobre e ferro, ocorrendo a formação de $\text{LOO}^\bullet$ e $\text{LO}^\bullet$, que participam na propagação da reação em cadeia. O término da peroxidação lipídica ocorre quando os radicais $\text{L}^\bullet$ e $\text{LOO}^\bullet$ produzidos nas etapas anteriores reagem entre si gerando outros produtos não radicalares. Nesse processo podem ser formados compostos carbonílicos no estado fundamental ($\text{L} = \text{O}$) ou no estado excitado triplete ($^3\text{L} = \text{O}$) e os alcoóis correspondentes (LOH) (figura 6), além de oxigênio singlete, aldeídos e cetonas (Ferreira e Matsubara, 1997; Oga *et al.*, 2008; Halliwell e Gutteridge, 1995).

1.3.1.2 BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Muitos produtos são formados na LPO, incluindo alcanos voláteis (por exemplo, gases etano e pentano), aldeídos, dienos conjugados e F_2 – isoprostanos.

O malonaldeído (MDA), figura 7, é um dos principais aldeídos formados a partir da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados e é atualmente o biomarcador mais utilizado por ser um dos produtos secundários da peroxidação mais conhecidos (Grotto *et al.*, 2008). O MDA possui ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo. Pode se ligar ao DNA e proteínas, atuando como mutagênico e aterogênico. O principal método de detecção do MDA é a reação com ácido tiobarbitúrico (TBA), que forma um complexo cromógeno (TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) que pode ser facilmente quantificado por métodos espectrofotométricos e cromatográficos com detecção no visível ou por fluorescência (Fang e Lin, 2008; Linden *et al.*, 2008).

Outro biomarcador que tem sido bastante descrito nos últimos anos para a análise do estresse oxidativo é o nucleosídeo oxidado 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo), uma importante lesão gerada por ataque de radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) ou oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) ao carbono 8 (C-8) da base guanina no DNA. Acredita-se que 8-oxodGuo seja um dos principais produtos resultantes do dano oxidativo ao DNA (Hong *et al.*, 2009). Tem um importante papel na carcinogenicidade, porque causa uma mutação pontual do tipo transversão de GC para TA, bastante encontrada em genes supressores de tumor e protooncogenes mutados. O nucleosídeo 8-oxodGuo,

por ser de fácil detecção, é muito utilizado como marcador de dano oxidativo ao DNA (Nakashima *et al.*, 2008; Loureiro *et al.*, 2002; Fang e Lin, 2008).

Reações de aldeídos resultantes do processo de LPO com bases do DNA dão origem a diversos adutos exocíclicos denominados propanoadutos, etenoadutos e adutos de malonaldeído. Publicações recentes têm apontado os adutos exocíclicos de DNA de origem endógena como ferramentas potenciais para o estudo do estresse oxidativo, da etiologia do câncer e para a avaliação da eficácia de agentes quimiopreventivos contra danos em DNA. Esforços têm sido feitos no sentido de elucidar as fontes, o significado toxicológico e as consequências genéticas dessas lesões de DNA; os tipos de fatores exógenos ou condições patofisiológicas que levam ao seu aumento; e se esses adutos, quando gerados através de reações mediadas por estresse oxidativo, desempenham um papel na carcinogênese humana ou em outras doenças degenerativas (Marnett e Plataras, 2001).

Figura 7. Biomarcadores de estresse oxidativo. Malonaldeído (MDA) e 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo).

1.3.2 LESÕES EM DNA

Estudos epidemiológicos mostram que a exposição a agentes exógenos é condição necessária para o desenvolvimento de 75 – 80% dos casos de câncer (Wogan *et al.*, 2004). Além dos danos biológicos provocados pelos próprios xenobióticos, compostos gerados endogenamente em concentrações acima da normalidade, como resultado da exposição a agentes exógenos, podem provocar aumento dos níveis de danos e também contribuir para os processos de mutagenese e carcinogênese. Nos dois casos, as lesões geradas devem ocorrer em frequência acima da capacidade de reparo do DNA para que mutações possam se fixar e levar a alterações nas funções de genes críticos para a manutenção da estabilidade do genoma (Loeb *et al.*, 2003).

Mecanismos intracelulares que levam à ativação de xenobióticos levam também à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), havendo uma combinação de fatores que resultam em aumento de lesões no DNA e mutações. A contribuição relativa das vias exógena e endógena para o aumento das mutações ainda é assunto de debate e estudos quantitativos comparativos incluindo lesões em DNA induzidas diretamente pelo agente e indiretamente por estresse oxidativo precisam ser realizados (De Bont e Van Larebeke, 2004). Danos endógenos ao DNA que podem ter sua frequência aumentada como resultado da exposição a xenobióticos incluem depurinação, desaminação, oxidação e formação de adutos com produtos gerados endogenamente (ex., aldeídos resultantes do processo de peroxidação lipídica e nitrosaminas). As lesões mutagênicas geradas são de grande interesse por permitirem intervenção farmacológica através da indução de defesas antioxidantes, as quais contribuem para diminuição dos níveis dessas lesões e são importantes para prevenção do envelhecimento, câncer e outras condições degenerativas (De Bont e Van Larebeke, 2004).

1.4 CITOTOXICIDADE

A síntese de novos compostos químicos tem aumentado anualmente e a quantidade de testes em animais utilizados para avaliação da sua segurança foi igualmente aumentada. O desenvolvimento de testes alternativos ao uso de animais em toxicologia tem sido objeto de estudo há três décadas (Piersma, 2006).

Técnicas de culturas celulares são amplamente empregadas, pois são econômicas, relativamente fáceis de serem mantidas e requerem pouco espaço físico. Podem ser utilizadas para preparar antígenos, anticorpos monoclonais, produzir vacinas, no isolamento de microorganismos, particularmente muitos vírus, e ainda na avaliação da toxicidade dos mais variados produtos (Cruz, 2003).

A utilização de sistemas de cultura celular tornou-se comum na avaliação toxicológica de produtos e misturas químicas. Estudos *in vitro* apresentam diversas vantagens. A primeira e mais óbvia é a de minimizar o uso de animais nas avaliações de toxicidade. Outra vantagem dos testes *in vitro* é a capacidade de se determinar mecanismos específicos de toxicidade. Assim, a ampla variedade de células dos muitos órgãos-alvo podem ser estudadas. Novos compostos sintetizados não são submetidos a todos os testes sob condições *in vivo* por limitações de Comitês de Ética em Pesquisa, fatores econômicos, legislação e outras razões (Kucera *et al.*, 2006; Putnam *et al.*, 2002).

A avaliação da citotoxicidade é importante na compreensão dos mecanismos de ação das substâncias químicas em células e tecidos. É mediadora em vários processos patológicos, incluindo carcinogênese e inflamação. Citotoxicidade também pode mediar a atividade de outros agentes, incluindo EROs e ERNs, agentes irritantes e toxicantes genotóxicos. Ao testar um composto quanto à sua ação citotóxica, muitos parâmetros biológicos podem ser analisados (Putnam *et al.*, 2002).

O fígado desempenha vários papéis essenciais na manutenção da fisiologia normal. É também um alvo vulnerável de muitas drogas ou xenobióticos porque está envolvido no metabolismo. Por conseguinte, o fígado é um dos principais órgãos testados em avaliações de segurança de drogas. Os sistemas mais importantes para o estudo da toxicidade e da atividade metabólica *in vitro* são fígado isolado perfundido, tecido hepático, células do fígado isoladas em suspensões ou em culturas primárias, técnicas especiais em 3D e frações subcelulares. Esses modelos podem ser utilizados para triagem de citotoxicidade e genotoxicidade, avaliação da capacidade hepatoprotetora de diferentes compostos e caracterização de mecanismos de hepatotoxicidade. Atualmente, não existe um sistema-modelo *in vitro* ideal de fígado para pesquisa de substâncias hepatotóxicas, no entanto o uso dos sistemas existentes reduz os custos econômicos e éticos e os problemas legislativos. Ensaio *in vitro* possibilitam estudar em detalhe os mecanismos de

hepatotoxicidade em comparação com as condições *in vivo*. Não podemos imaginar a pesquisa atual de toxicidade hepática sem usar esses sistemas-modelo (Kucera *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2003).

Hepatócitos humanos são células metabólicas totalmente competentes. Elas retêm a expressão de enzimas de fase 1 e fase 2 por diversos dias em cultura, e são capazes de gerar um perfil metabólico similar à droga àquele encontrado *in vivo*, que é quando eles são considerados o modelo padrão ouro para o metabolismo do xenobiótico e estudos de toxicidade. No entanto, seu uso generalizado é bastante prejudicado pela escassez de amostras adequadas de fígado humano. Além disso, a bem conhecida instabilidade fenotípica *in vitro* de hepatócitos, a irregular disponibilidade de fígados humanos frescos para efeitos de coleta das células, e a alta variabilidade funcional de lote para lote de preparações de hepatócitos obtidos de fígados de doadores diferentes, complica seriamente seu uso na rotina de testes. Para superar essas limitações, diferentes modelos de linhagem celular têm sido propostos para o *screening* do metabolismo de drogas nos recentes anos. Linhagens celulares derivadas de fígado humano seriam modelos ideais para esse propósito, dada sua disponibilidade, ilimitado tempo de vida, fenótipo estável, e o fato de serem facilmente manipuladas (Gómez-Lechón *et al.*, 2008).

Células HepG2 foram isoladas em 1979 a partir de um hepatoblastoma primário de um garoto argentino de 11 anos de idade. Essa linhagem apresenta morfologia semelhante ao epitélio e ao parênquima hepático, além de manter a capacidade de sintetizar e secretar a maioria das proteínas plasmáticas características das células normais do fígado humano (Knasmüller *et al.*, 1998). A linhagem HepG2 é metabolicamente competente, possuindo atividade de enzimas de fase I tais como CYP1A1, CYP1A2 e CYP2E1 e fornece um modelo usual para detecção de mutágenos ambientais com necessidade de ativação a mutágenos finais pelo sistema enzimático do citocromo P450 (Yuan *et al.*, 2008). Sugere-se que a análise de múltiplos *endpoints* em células HepG2 pode prever a hepatotoxicidade de substâncias com 80% de sensibilidade e 90% de especificidade. Essa linhagem possui a vantagem de ser facilmente cultivada, ser estável, derivada de humano e órgão-específica (Noor *et al.*, 2009). Neste estudo utilizamos células HepG2 como um modelo experimental para a avaliação da citotoxicidade e o dano oxidativo provocado pelas soluções de *light sticks*.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar soluções de *light sticks* quanto à reatividade com biomoléculas *in vitro* e quanto à citotoxicidade e genotoxicidade em células HepG2.

Objetivos específicos:

Analisar a reatividade dos conteúdos de *light sticks* com 2'- desoxiguanosina (dGuo), albumina e DNA *in vitro*.

Caracterizar o aduto formado com dGuo por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear.

Verificar a citotoxicidade de soluções de *light sticks* em células em cultura, linhagem HepG2, pelos ensaios do XTT (atividade da cadeia respiratória mitocondrial), do corante cristal violeta (sobrevivência celular) e da enzima lactato desidrogenase extravasada (integridade da membrana plasmática).

Investigar a ocorrência de dano oxidativo em células HepG2 tratadas com soluções de *light sticks*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Todas as substâncias empregadas neste trabalho são do mais alto grau de pureza disponível comercialmente. Etanol foi obtido da empresa Cinética Química (São Paulo, SP, Brasil). Fosfato de potássio, ácido acético, metanol e acetonitrila grau HPLC foram obtidos da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). Os kits para os ensaios do 2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT) e da lactato desidrogenase foram adquiridos da empresa *Xenometrix* (Allschwil, Suíça). Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), soro fetal bovino (SFB) e a solução de tripsina/EDTA foram adquiridos da Cultilab (Campinas, SP, Brasil). Bastões de light sticks foram coletados em praias do nordeste brasileiro pela ONG “Lighthouse Foundation” e gentilmente doados por Fabiano P. Barreto. Bastões novos foram obtidos da marca *JDL light stick*. Todos os outros reagentes foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO). A água foi purificada em um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA).

3.2 Equipamentos

As centrifugações dos tubos de 1,5 – 2 mL foram feitas na centrífuga Hettich Zentrifugen Mikro 120 (Alemanha). Para incubações com agitação e controle de temperatura a incubadora foi a Labnet International, modelo Vortemp 56 (Woodbridge, New Jersey, USA). Foi utilizado um agitador de tubos (vórtex) marca Phoenix AP56 (Araraquara, SP, Brasil). E a incubadora de CO₂ para células marca Thermo electron corporation (Estados Unidos). As análises microscópicas foram feitas no microscópio invertido marca Leica DMI 4000 B (Alemanha). A manipulação das células e de materiais estéreis foram feitas dentro do fluxo laminar vertical marca Pachane modelo PCR-2 (Piracicaba, SP, Brasil). Quando as soluções foram preparadas sob agitação, o agitador magnético modelo Biomixer 78hW-1 Constant Temperature foi utilizado, e a medida do pH determinada pelo potenciômetro digital marca PHTEK, modelo PHS-3B (São Paulo, Brasil). Os espectros de absorbância foram adquiridos pelo espectrofotômetro marca Biochrom Libra S12 (Inglaterra),

software BioDC versão 2.0. Ou quando a leitura foi de microplacas, pelo espectrofotômetro Power Wave X340 (Bio-Tek instruments, INC., Winooski, VT). A remoção da fase orgânica das sucessivas coletas de picos (corridas cromatográficas) foi possível pelo uso do Speed Vac[®] (BocEdwards, Brasil). As liofilizações foram feitas em dois equipamentos distintos: (1) por um sistema constituído por uma bomba a vácuo de alta performance, modelo VLP120, da Savant (Savant instruments, Holbrook, NY) e um concentrador modelo 5301 da Eppendorf ou; (2) pelo liofilizador de bancada (Liotop L101, Liobras Ind. Com. Serv. Liofilizadores Ltda.). Outros equipamentos foram uma balança semi-analítica marca Bioprecisa FA2104N (Tóquio, Japão) e o banho em água modelo 245, (Cientec, Piracicaba, SP, Brasil).

3.2.1 Análises por HPLC/PDA e HPLC-ESI-MS/MS

HPLC/PDA:

As análises por HPLC/PDA foram feitas em um equipamento da Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AT, um detector de arranjo de fotodiodos PDA-20AV, um auto-injetor (Proeminence SIL-20AC) e um forno para colunas (CTO-10AS/VP) controlado por um módulo comunicação CBM-20A e o software LC-Solution disponível em nosso laboratório.

HPLC-ESI-MS/MS - Equipamento 1:

Análises por HPLC-ESI-MS/MS foram feitas em um espectrômetro de massas Quattro II (Micromass, Manchester, Reino Unido) disponível no laboratório do Professor Paolo Di Mascio (IQ USP, São Paulo, Brasil). Um sistema de HPLC da Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japão) constituído de um injetor automático (SIL-10AD/VP), um injector Rheodyne (Cotati, CA), uma válvula automática de comutação de fluxo (FCV-12AH), duas bombas (Class LC 10AD) e um detector de absorvância SPD-10AV/VP, controlados por um módulo de comunicação (SCL-10A/VP) e o software Class-VP, foi utilizado para injeção das amostras e limpeza da coluna analítica. A temperatura da fonte do espectrômetro de massas foi mantida em

100°C e as taxas de vazão do gás (nitrogênio) de secagem e nebulização foram otimizadas para 350 e 10 L/h, respectivamente. Os dados foram processados utilizando o software MassLynx (Micromass).

HPLC-ESI-MS/MS - Equipamento 2:

Para as análises de 8-oxodGuo utilizamos um sistema de HPLC-ESI-MS/MS mais sensível disponível no laboratório do Professor Paolo Di Mascio (IQ USP, São Paulo, Brasil). O sistema consiste de um HPLC da Agilent, constituído por duas bombas (Agilent 1200 G1312B e Agilent 1200 G1310A), um forno de coluna (Agilent 1200 G1316B), um detector de arranjo de diodos (DAD) (Agilent 1200 DAD G1315C) e um auto injetor (Agilent 1200 G1367C), acoplado a um espectrômetro de massas *Linear Quadrupole Ion Trap*, modelo 4000 QTRAP, da Applied Biosystems Sciex Instruments (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). Os dados obtidos foram analisados pelo software Analyst 1.4.2 (Life Technologies Corporation).

3.2.2 Análises por MALDI/TOF/MS

Para a obtenção de espectros de massas de albumina foi utilizado o equipamento Ettan MALDI-TOF Pro da Amersham Biosciences (GE Healthcare, United Kingdom), disponível no laboratório do Prof. Paolo Di Mascio, IQ USP. Os dados foram analisados com o software Ettan MALDI-TOF Pro, versão 2.0.

3.3 Incubações de dGuo com soluções de *light stick*

Esta etapa do trabalho teve a colaboração da Dra. Raquel Bagattini (UNIP, SP) em período anterior ao início desta pesquisa. Utilizamos soluções de bastões de *light sticks* capturados em praias (detalhes subitem 3.8.4). Dentro de cada bastão temos principalmente soluções de coloração amarela ou vermelha. Retiramos as soluções de dois desses bastões (um de coloração amarela e outro de coloração vermelha). Fizemos incubações de dGuo com cada uma dessas soluções da forma descrita a seguir.

dGuo (1 mg) em 500 μ L de tampão acetato (50 mM, pH 4), 500 μ L de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) ou 500 μ L de tampão carbonato (50 mM, pH 11) foi incubada com 500 μ L de cada uma das soluções de *light stick* por 72 h a 37 °C sob agitação. Ao final desse período foi feita uma centrifugação (200 rpm, 5 min) para separação de duas fases, sendo coletada a fase aquosa superior para análise por HPLC/PDA ou HPLC-ESI-MS.

Incubações de dGuo (0,5 mg) em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,4, V_{final} 500 μ L) com diferentes volumes da solução de *light stick* amarela (10 μ L, 50 μ L, 100 μ L, 200 μ L) por 24 h foram feitas para verificarmos se o aduto podia ser facilmente observado com o uso de menores concentrações da solução de *light stick*. Observamos claramente a formação do aduto utilizando o volume de 100 μ L de solução de *light stick*.

Incubamos então dGuo (1 mg) em 800 μ L de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,4) com 200 μ L de cada uma das soluções de *light stick* sob agitação a 37 °C. Alíquotas de 100 μ L de cada uma dessas incubações foram retiradas após 30 min, 2 h, 4 h, 8 h, 14 h e 24 h. As amostras foram centrifugadas como descrito acima e a fase aquosa foi analisada por HPLC/UV-ESI-MS para verificarmos a cinética de formação do aduto em função do tempo de incubação.

Finalmente, realizamos 50 incubações de dGuo (1,25 mg) em 500 μ L de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,4) com 100 μ L de solução de *light stick* sob agitação a 37 °C por 24 h, totalizando a massa de 60 mg de dGuo incubada. A partir dessas incubações foi purificado o aduto para obtenção dos espectros de ^1H RMN. Considerando as áreas de dGuo e do aduto nos cromatogramas obtidos por HPLC/PDA, calculamos o rendimento da reação como sendo de aproximadamente 1%. A purificação foi feita utilizando-se o sistema de HPLC/PDA descrito no item 3.2.1 com a condição cromatográfica detalhada abaixo. Incubações controles foram feitas na ausência de dGuo e na ausência de *light stick*.

Condição cromatográfica para purificação do aduto dGuo-*light stick*:

Coluna Luna C18(2) 250 mm x 4,6 mm i.d., 5 μ m (Phenomenex, Torrance, CA) eluída com um gradiente de água $\rightarrow$ metanol (5 a 30% de metanol em 20 min, 30 a 50% de 20 a 30 min, 50 a 100% de metanol de 30 a 32 min, 100 a 5% de metanol de 32 a 34 min, 5% de metanol de 34 a 44 min) a um fluxo de 1 mL/min. A temperatura

da coluna foi mantida constante em 30°C pelo forno acoplado ao equipamento. Nessas condições o par de isômeros do aduto elui entre 26 e 28 min.

3.4 Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Após sucessivas coletas do aduto, todas as frações foram combinadas e liofilizadas. O produto resultante passou por mais uma purificação utilizando-se o mesmo sistema descrito acima antes da completa liofilização para a realização das análises espectroscópicas. O concentrado do aduto seco foi então ressuspense em aproximadamente 700 µL de dimetil sulfóxido- d_6 99,9 atm %D (DMSO- d_6) e encaminhado à Central Analítica do Instituto de Química-USP para obtenção dos espectros de ^1H RMN e ^1H - ^1H COSY. Os espectros foram obtidos em um espectrômetro DRX-500 MHz (Bruker, MA) e foram registrados com e sem supressão do pico de água. O pico do solvente foi usado como referência.

3.5 Espectros de Massas (ESI/MS)

Os espectros de massas foram obtidos com ionização por *electrospray* no modo positivo utilizando-se o equipamento 1 descrito no item 3.2.1. Para as análises foi utilizada a condição cromatográfica descrita abaixo. Espectros de massas em MS_1 e espectros em MS_2 dos fragmentos de íons selecionados em MS_1 (ESI-MS/MS) foram adquiridos no intervalo de 100 – 800 m/z com diferentes voltagens de cone. Para os espectros em MS_2 foi utilizada pressão do gás de colisão (argônio) na célula de colisão em 1×10^{-6} mbar e energia de colisão em 10 eV. Simultaneamente foi feita a detecção por absorbância em 255 nm.

Condição cromatográfica para as análises:

Coluna Luna C18 (2) (150 mm x 2 mm id, 3 µm, Phenomenex, Torrance, CA) eluída com um gradiente de ácido fórmico (0,1% em água) e acetonitrila (de 0 a 60 min, 5 a 100% de acetonitrila), com fluxo de 0,12 mL/min.

3.6 Análise da formação do aduto em DNA incubado com solução de *light stick* *in vitro*

DNA (1 mg) em 500 μ L de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) foi incubado com 100 μ L da solução de *light stick* coletada na praia (detalhes no item 3.8.4) por 21 h a 37 °C sob agitação (140 rpm). Ao final desse período foi feita uma centrifugação (10.000 rpm, 8 min) para separação de duas fases, sendo coletada a fase aquosa superior. Para remoção de resquícios de *light stick* que podiam ainda contaminar a solução de DNA, foi feita uma extração com 500 μ L de clorofórmio (1:1, 10.000 rpm, 8 min) e o sobrenadante foi recolhido em novo tubo. O mesmo procedimento foi utilizado para obtenção de amostras de DNA controle (incubações na ausência de *light stick*). As concentrações das amostras de DNA foram determinadas pela medida de absorbância em 260 nm. Para as análises por HPLC-ESI-MS/MS, alíquotas de DNA foram hidrolisadas enzimaticamente, como descrito abaixo.

A uma alíquota de solução contendo 200 μ g de DNA, adicionou-se 5 μ L de tampão Tris-HCl-MgCl₂ (200 mM, pH 7,4). O volume final foi ajustado com água para 100 μ L. Em seguida, foi adicionada DNase 1 (20 unidades) e a amostra incubada a 37°C por 1 h. Então, foram adicionados 0,008 unidade de fosfodiesterase 1 (PDE1) e 20 unidades de fosfatase alcalina, com nova incubação a 37°C por 1 h. Após centrifugação a 14.000 rpm, 10 min, o sobrenadante foi injetado no sistema HPLC-ESI-MS/MS equipamento 1 descrito no item 3.2.1. A eluição foi feita através de uma coluna Luna C18(2) (150 mm x 2.0 mm i.d., 3 μ m, Phenomenex) com fase móvel constituída de ácido fórmico (0,1% em água) e acetonitrila (de 0 a 60 min, 5 a 100% de acetonitrila), com fluxo de 0,12 mL/min. A detecção do aduto foi feita no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) do espectrômetro de massas, selecionando-se as seguintes fragmentações: m/z 408 $\rightarrow$ m/z 292, m/z 292 $\rightarrow$ m/z 246, m/z 410 $\rightarrow$ m/z 294.

3.7 Incubações de albumina com soluções de *light stick* e análise da massa da albumina por MALDI/TOF/MS

Esta etapa do trabalho teve a colaboração da Dra. Raquel Bagattini, UNIP, SP.

Incubações de albumina (0,5 mg) em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4, V_{final} 300 μ L) com diferentes volumes de cada uma das soluções de *light stick* (5 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 40 μ L) foram feitas por 24 h a 37°C sob agitação. Ao final das incubações as amostras foram centrifugadas (200 rpm, 5 min) para separação de duas fases,

sendo coletada a fase aquosa superior (150 μ L) que foi diluída com mais 200 μ L de água para análise por MALDI/TOF/MS para verificação de alteração da massa da albumina.

A espectrometria de massas por dessorção a laser assistida por matriz (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* - MALDI) é comumente empregada na análise de proteínas. O analisador de massas usualmente associado à dessorção a laser é o tempo de voo, com sigla em inglês TOF (*time-of-flight*). Nesse analisador as moléculas ionizadas são aceleradas em um tubo a vácuo, chegando ao detector de acordo com o tempo de voo, que é proporcional à massa molecular (Cunha, *et. al.*, 2006). Para as análises, as amostras obtidas da incubação descrita acima foram misturadas a uma matriz constituída de ácido sinapínico (10 mg/mL em acetonitrila:ácido trifluoroacético 0,5%, 1:1). Diluições de 6, 11 e 21 vezes das amostras foram feitas utilizando-se a matriz. Volumes de 0,5 μ L foram aplicados nos spots da placa do MALDI para análise. Foram utilizados 200 pulsos de laser com voltagem de 20 kV. Utilizamos o equipamento Ettan MALDI-TOF Pro da Amersham Biosciences (GE Healthcare, United Kingdom), disponível no laboratório do Prof. Paolo Di Mascio, IQ USP. Os dados foram analisados com o software Ettan MALDI-TOF Pro, versão 2.0.

3.8 Soluções de light stick utilizadas nas incubações com células

3.8.1. Solução Externa	Dispersa no bastão plástico, contendo H ₂ O ₂ , éster de ftalato e salicilato de sódio (figura 2a).
3.8.2. Solução Interna	Presente no bastão de vidro ainda íntegro (antes da reação de quimioluminescência). Contém o HPA 9,10-difenilantraceno (DPA), n-butil ftalato e o éster de oxalato TCPO (figura 2a).
3.8.3. Mistura recém	Solução interna e externa homogeneizadas previamente ao ensaio (ocorrida a reação quimioluminescente) (figura 2c).
3.8.4. Mistura oxidada	Conteúdo de bastões capturados na praia, com provável modificação química por possíveis reações de oxidação (figura 2d).

3.9 Cultivo e expansão celular

A linhagem HepG2, células de carcinoma hepatocelular humano, foi gentilmente fornecida pela Professora Mari C. Sogayar (IQ USP, São Paulo, Brasil). Esta linhagem celular tem sido bastante utilizada em estudos de toxicidade.

A cultura foi mantida em meio DMEM suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB), 10 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 1,2 mg/mL de bicarbonato de sódio. Foi utilizado filtro com membrana de 0,22 μ m (TPP, Suíça) para esterilização do meio de cultura em atmosfera estéril. As células foram mantidas a 37°C, em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂.

O repique de células foi feito da seguinte forma:

Após retirada do meio de cultura das garrafas plásticas, a cultura foi lavada 2 vezes com tampão salina fosfato (PBS). A seguir foi incubada a 37°C com volume mínimo de solução de tripsina (1-2 mL) por 5 minutos. As células desprendidas do fundo da garrafa foram transferidas a outra garrafa de maior tamanho ou para tubos plásticos de 15 mL para diluição em meio de cultura e contagem, com posterior transferência a placas de 96 poços (5×10^4 células/poço) ou placas de 133 mm de diâmetro ($1,15 \times 10^6$ células).

A manipulação das células foi feita em fluxo laminar e com materiais estéreis.

3.10 Descrição das incubações para os ensaios de citotoxicidade e análise de 8-oxodGuo

As soluções detalhadas no item 3.8 utilizadas nos experimentos para avaliação de citotoxicidade e dano oxidativo foram diluídas em meio de cultura imediatamente antes das incubações com as células, conforme descrito abaixo. Células sem adição de *light stick* foram utilizadas como controle em cada experimento.

3.10.1 Ensaios de citotoxicidade

Preparo das diferentes soluções de *light stick* para as incubações com as células:

Na tabela 2 são apresentados os volumes das soluções de *light stick* aliquoteados no meio de cultura. De cada uma das quatro soluções de *light stick* descritas nos subitens 3.8.1 a 3.8.4, foram preparadas quatro diluições, obtendo-se então o número total de dezesseis soluções para incubações com as células. Em tubos plásticos contendo 8 mL de meio DME enriquecido com 15% de soro fetal bovino (SFB) foram adicionados os volumes de 1 a 10 μ L das soluções de *light stick*, obtendo-se concentrações de 0,0125 a 0,12% v/v (dados na última coluna do quadro). As soluções foram agitadas no vortex e imediatamente 200 μ L foram transferidos para cada poço contendo as células aderidas. Cada experimento foi realizado em quadruplicata. O período de exposição das células às soluções foi de 16 h em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ a 37° C para todos os ensaios.

As leituras de absorbância foram feitas em um leitor de placa de ELISA (Power Wave X340, Bio-Tek instruments, INC., Winooski, VT) disponível no laboratório da Professora Tania Marcourakis (FCF USP, São Paulo, Brasil).

Tabela 2. Diluições das soluções de *light stick* utilizadas nos ensaios de citotoxicidade com células HepG2.

Soluções { interna externa recém oxidada (item 3.8)	Volume de cada solução de light stick	Volume do diluente (meio DMEM + 15% SFB)	Concentração final de light stick (% v:v)
	1 μ L	8 mL	0,0125%
	2 μ L	8 mL	0,025%
	4 μ L	8 mL	0,05%
	10 μ L	8 mL	0,12%

3.10.1.1 Corante cristal violeta (CVD)

Como as células mortas não aderem às placas de cultura, é possível avaliar a sobrevivência celular através da coloração das células aderidas com o corante cristal violeta. Este ensaio foi iniciado com um kit comercial (marca *Xenometrix®*). Após verificarmos a aplicabilidade deste ensaio às nossas investigações de citotoxicidade, foi formulada em nosso laboratório a solução do corante cristal violeta. Sendo os demais reagentes de fácil obtenção, o ensaio foi realizado com menores custos.

Após o término do período de exposição das células às soluções de *light stick*, o meio de cultura foi removido e as células foram cuidadosamente lavadas duas vezes com 200 µL de PBS. Após aspiração do PBS, foram adicionados 100 µL de metanol para fixação das células. O solvente foi removido e adicionou-se 50 µL da solução do corante (1% de cristal violeta em metanol 20%). A placa foi incubada por dez minutos em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. A seguir, a solução de corante foi removida e as células foram lavadas 4 vezes com 200 µL de PBS. A camada celular foi dissolvida pela adição de 200 µL de ácido acético 30%. Os valores de absorbância (OD = OD_{570 nm} - OD_{690 nm}) foram aferidos fazendo-se a leitura teste no comprimento de onda de 570 nm e a leitura de referência no comprimento de onda de 690 nm usando-se um espectrofotômetro com leitor de microplaca. Os resultados foram expressos em porcentagem relativa ao grupo controle.

3.10.1.2 Sal tetrazólio (XTT)

Quando o sal tetrazólio (2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolium-5-carboxanilida de sódio) (XTT) de coloração amarela é convertido a formazan por clivagem redutiva do anel tetrazólio, formam-se cristais solúveis de coloração laranja que podem ser quantificados espectrofotometricamente. Uma vez que a succinato desidrogenase mitocondrial está envolvida na redução celular de sais tetrazólio, ensaios desse tipo servem para a avaliação da citotoxicidade, uma vez que as enzimas estarão ativas em mitocôndrias intactas e, portanto, células vivas (Putnam *et al.*, 2002).

Após o término do período de exposição das células às soluções de *light stick*, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com solução salina

fosfato tamponada (PBS) pH 7,0 e um novo meio de cultura com 5% de SFB (200 µL/poço) foi adicionado. Uma solução pré-formulada de 50 µL do reagente XTT (reagente XTT : tampão = 100:1) foi então adicionada a cada poço e a placa de cultura foi incubada por 1 hora a 37°C, 5% de CO₂. Os valores da absorbância (OD = OD_{450 nm} - OD_{690 nm}) foram aferidos fazendo a leitura no comprimento de onda de 450 nm, com a leitura de referência no comprimento de onda de 690 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem relativa ao grupo controle.

3.10.1.3 Lactato desidrogenase (LDH)

A liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) para o meio de cultura foi avaliada como marcador de dano à membrana plasmática. LDH usa NADH para reduzir piruvato a lactato. O ensaio mede o consumo de NADH no meio de cultura pelo decaimento da absorbância em 340 nm (Lin *et al.*, 2009). Após o período de exposição das células às soluções de *light stick*, 20 µL do meio de cultura foram coletados e transferidos para uma nova placa de 96 poços. Uma solução contendo NADH e piruvato (5:1, 240µL) foi então adicionada à nova placa, iniciando a reação. Imediatamente os valores de absorbância foram aferidos em modo cinético, fazendo leituras a 340 nm a cada 20 segundos pelo período de 25 minutos, a 37°C. Os resultados são expressos como porcentagem da taxa máxima de consumo de NADH (NADH/min), obtida por lise das células com 1% de Triton X-100, denominado como controle positivo.

3.10.2 Incubações de células HepG2 com soluções de *light stick* para extração de DNA e análise de 8-oxodGuo

Para extração do DNA, células HepG2 foram repicadas para placas de 133 mm de diâmetro. Após atingirem a confluência, foram feitas incubações com as diferentes soluções de *light stick* descritas no item 3.8.

Preparo das diferentes soluções de *light stick* para as incubações com as células:

Na tabela 3 são apresentados os volumes das soluções de *light stick* aliquotados no meio de cultura. De cada uma das quatro soluções de *light stick* descritas nos subitens 3.8.1 a 3.8.4, foram preparadas duas diluições, obtendo-se então o número total de oito soluções para incubações com as células. Em tubos plásticos contendo 20 mL de meio DME enriquecido com 15% de soro fetal bovino (SFB) foram adicionados os volumes de 0,6 ou 1,2 μL das soluções de *light stick*, obtendo-se concentrações de 0,003 ou 0,006% v/v (dados na última coluna do quadro). As soluções foram agitadas no vortex e imediatamente transferidas para cada placa contendo as células aderidas. Cada experimento foi realizado em triplicata. O período de exposição das células às soluções foi de 16 h em incubadora com atmosfera de 5% de CO_2 a 37° C.

Tabela 3. Diluições das soluções de *light stick* utilizadas nas incubações com células HepG2 para extração de DNA e análise de 8-oxodGuo.

Soluções { interna externa recém oxidada (item 3.8)	Volume de cada solução de light stick	Volume do diluente (meio DMEM + 15% SFB)	Concentração final de light stick (% v:v)
	0,6 μL	20 mL	0,003 %
	1,2 μL	20 mL	0,006 %

3.10.2.1 Extração do DNA

Foi seguido o procedimento descrito no kit Gentra® PureGene® da QIAGEN® (Valencia, CA) para purificação de DNA de células em cultura. Resumidamente, após as incubações, células HepG2 de cada placa de cultura foram ressuspensas em 10 mL de meio de cultura sem soro fetal bovino, transferidas para tubos de centrífuga e precipitadas a 2.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas pela adição de 3 mL de solução de lise de células (*Cell Lysis Solution*) contendo desferroxamina 0,1 mM (DFOSA) e 30 μL de RNase A (15 mg/mL), com incubação por 60 minutos a 37°C. A remoção das proteínas foi feita pela adição de 1 mL da solução de precipitação de proteínas (*Protein Precipitation*

Solution) contendo DFOSA 0,1 mM e feita a centrifugação por 10 minutos, 2.000 x g, 10 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 5 mL de isopropanol gelado para a precipitação do DNA (3 min, 2.000 x g, 10 °C). O DNA precipitado foi lavado com 3 ml de etanol 70% contendo DFOSA 0,1 mM e ressuspenso em 200 µL de solução de desferroxamina (0,1 mM). A concentração do DNA foi determinada pela leitura de absorbância em 260 nm e sua pureza pela razão das absorbâncias em 260 e 280 nm.

3.10.2.2 Hidrólise enzimática do DNA

A hidrólise enzimática do DNA foi feita segundo o procedimento descrito abaixo.

Adicionou-se 5 µL de tampão Tris-HCl-MgCl₂ 200 mM (pH 7,4) a uma alíquota de solução contendo 100 µg de DNA e 250 fmol de [¹⁵N₅]-8-oxodGuo (padrão interno sintetizado e purificado em nosso laboratório pelo estudante Tiago Franco de Oliveira de acordo com o procedimento descrito por MANGAL *et al.*, 2009). Em seguida, foi adicionada DNase 1 (10 unidades) e a amostra incubada a 37 °C por 1 h. Então, foi adicionada 0,004 unidade de fosfodiesterase 1 (PDE1) e 10 unidades de fosfatase alcalina, com nova incubação a 37°C por 1 h. O volume final da solução foi ajustado para 100 µL com solução de desferroxamina 0,1 mM. O volume de 20 µL do DNA hidrolisado (20 µg de DNA e 50 fmol do padrão interno) foi injetado no sistema descrito abaixo.

3.10.2.3 Análise de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina

Para determinação de 8-oxodGuo, amostras de DNA hidrolisado enzimaticamente foram analisadas através do espectrômetro de massas Linear Quadrupole Ion Trap, modelo 4000 Q TRAP (AB Sciex Instruments, USA) disponível no laboratório do Professor Paolo Di Mascio (IQ USP, São Paulo, Brasil), como descrito no item 3.2.1 (equipamento 2). O espectrômetro de massas foi operado em modo positivo com detecção por monitoramento de reação múltipla (MRM). As fragmentações selecionadas foram 289,2 → 173,2 (padrão interno [¹⁵N₅]-8-oxodGuo) e 284,2 → 168,2 (8-oxo-2'-desoxiguanosina). O detector DAD foi fixado em

250 nm para a indentificação dos desoxinucleosídeos normais e quantificação de dGuo. Curvas de calibração, feitas no intervalo da quantidade de dGuo e 8-oxodGuo esperadas nas amostras, foram utilizadas para a quantificação. Em seguida, a fração molar 8-oxodGuo/dGuo presente em cada amostra de DNA foi determinada. Os dados foram processados utilizando o software Analyst 1.4 (Applied Biosystems, USA). Todos os solventes utilizados foram previamente filtrados e degaseificados.

Condição cromatográfica: Coluna Luna C18 (2) 150 mm x 2,0 mm ID, 3 μ m (Phenomenex, Torrance, CA) eluída com fase móvel constituída de 5% acetonitrila em tampão acetato de amônio (15 mM, pH 6,6), em modo isocrático, com fluxo de 0,150 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 30 °C.

3.11 Análise estatística

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Para testar a significância das diferenças entre os grupos controles e tratados foi utilizado o teste One-way ANOVA. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização Química das Soluções de *Light Stick*

Em 1968 Rauhut e colaboradores publicaram a patente 3,399,137 da Empresa Americana *Cyanamid* na qual é descrita a geração de luz pela reação de anidridos de ácido oxálico com um peróxido na presença de uma substância fluorescente (Rauhut *et al.*, 1968). Os inventores citaram vários compostos que podem ser empregados nas reações (Tabela 4) e descreveram o uso de duas fases líquidas separadas (como já descrito na Introdução), onde em um tubo está contida a fase com o peróxido de hidrogênio e em outro a fase com o composto fluorescente. Os autores buscaram ainda a melhora da intensidade e maior tempo de duração da emissão da luz, pois o tempo curto (na ordem de 8 a 30 segundos) tornava pouco prática a utilidade da reação entre o cloreto de oxalila e o peróxido de hidrogênio aquoso (30%). Assim, o invento visou à seleção de uma composição que pudesse melhorar o processo de geração de luz, com o emprego de compostos que aumentassem a duração e a intensidade de emissão por um mecanismo simples, com compostos baratos, estáveis por longos períodos, e que não fossem perigosos (Rauhut *et al.*, 1968). Seguidamente surgiram várias outras patentes (Kennerly *et al.*, 1970; Ridgefield *et al.*, 1971; Maulding, 1975; Richter *et al.*, 1976; Zandt, 1977; World, 1985). Em 1985 a patente de número 4,508,642 teve como objeto de invenção a utilização de éster aromático de ácido oxálico, peróxido de hidrogênio e um catalisador, todos em um solvente adequado (dimetil ftalato e/ou dibutil ftalato) para obtenção do aumento do tempo de duração do sistema quimioluminescente (World, 1985). Na tabela a seguir estão apresentadas as substâncias descritas nas patentes citadas.

Tabela 4. Substâncias utilizadas na reação quimioluminescente de *light sticks*

<i>Solvente para a fase contendo o éster de oxalato e o fluoróforo</i>	<i>Solvente para a fase contendo peróxido de hidrogênio</i>	<i>Hidrocarboneto policíclico aromático</i>	<i>Ésteres de oxalato</i>
Ésteres: etil acetato, dimetil ftalato ² , dibutil ftalato ² Hidrocarbonetos aromáticos: benzeno e tolueno	Álcoois: etil, hexil, butanol, pentanol Ésteres: etil acetato, dimetil ftalato ² , dibutil ftalato ² Éteres: dietil éter, diamil éter Hidrocarbonetos aromáticos: benzeno e tolueno	Antraceno, antraceno substituído, naftaceno, naftaceno substituído, pentaceno, pentaceno substituído (ver tabela 1 na introdução)	bis(2,4,5-triclorofenil-6-carbopentoxifenil)-oxalato (CPPO) ² ou bis(2,4,6-triclorofenil)-oxalato (TCPO)

² substâncias citadas somente na patente 4,508,642 (1985)

Um passo importante ao se trabalhar com as soluções de *light sticks*, constituídas de misturas de diferentes substâncias, é a caracterização química das mesmas. Apesar de possuímos informações gerais dos fabricantes quanto aos possíveis constituintes dessas soluções, não há na embalagem uma descrição da sua composição. Dessa forma, procuramos identificar o HPA, o éster de oxalato e o ftalato presentes nas soluções que utilizamos. Para isso, pequenas alíquotas das soluções interna, externa, recém misturada e de tubos coletados em praias (verificar item 3.8) foram injetadas nos sistemas de HPLC/PDA e HPLC-ESI-MS/MS (item 3.2.1).

Dados espectrométricos obtidos de uma estrutura desconhecida podem ser comparados com aqueles disponíveis na literatura, um procedimento comum para elucidação estrutural de moléculas. Assim, os “handbooks” e as bibliotecas digitais são excelentes auxiliares nesta tarefa. Na espectrometria de massas ocorre a ionização e subsequente fragmentação de moléculas, sendo possível a determinação das razões massa/carga (m/z) e as abundâncias relativas (0 a 100%) dos íons que são produzidos. Os grupos funcionais em uma molécula fragmentam-se de tal forma que, conhecendo-se a estrutura da molécula, é possível prever o padrão de fragmentação. Ao contrário, conhecendo-se o padrão de fragmentação, a

possível estrutura da molécula original pode ser sugerida. Além disso, a técnica permite a obtenção da massa molecular da substância analisada.

A partir das análises espectrométricas das soluções de *light sticks* classificadas neste estudo como LS vermelho (emissão de luz azul) e a comparação dos dados espectroscópicos obtidos com as informações presentes em patentes, caracterizamos alguns constituintes. Apresentamos a seguir os espectros de massas obtidos e as estruturas químicas. Como já ressaltado por revisão bibliográfica, a solução interna de LS contém o éster de oxalato e o hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) dissolvidos em um éster de ftalato. A solução externa é constituída por peróxido de hidrogênio e salicilato, também dissolvidos em um éster de ftalato.

Em amostras dos LS encontrados nas praias, quando presente, existem apenas traços de peróxido de hidrogênio. A reação de quimioluminescência consome totalmente este reagente, com rápida decomposição do peróxido à água e oxigênio quando exposto à luz solar (Stevani *et al.*, 2005). Em nossos experimentos não foram incluídas análises desse constituinte.

Na figura 8 é apresentado o cromatograma correspondente à injeção de uma alíquota da solução interna de LS no sistema de HPLC/UV/ESI-MS/MS ($\lambda = 255$ nm). Analisando-se os espectros de massas dos principais constituintes dessa solução, identificamos o éster de ftalato, o éster de oxalato e o HPA presentes (Figuras 9, 10, 11 e 12).

Figura 8. Solução interna do LS. Cromatograma obtido com detecção por UV em 255 nm no sistema de HPLC/UV/ESI-MS/MS. Método descrito em Materiais e Métodos, item 3.5.

Para a identificação do éster de ftalato, primeiramente obtivemos um espectro de massas em MS_1 a partir do cromatograma apresentado na Figura 8. Nesse espectro foi possível identificar a presença de um íon com m/z 279 eluindo em 50 min. Selecionamos então esse íon no primeiro analisador (MS_1) e induzimos sua fragmentação, obtendo-se o espectro no segundo analisador (MS_2) apresentado na Figura 9. Os íons fragmentos obtidos e os dados da literatura nos permitem afirmar que o solvente presente na solução interna dos *light sticks* que utilizamos em nossos experimentos é o di-n-butil-ftalato.

Figura 9. Espectro de massas do di-n-butil ftalato presente na solução interna de LS (tempo de retenção de ~ 50 min na Figura 8). O espectro foi obtido em MS₂ com seleção dos íons fragmentos de m/z 279.

Bis[2,4,6-triclorofenil]-oxalato (TCPO) é um dos oxalatos descritos na literatura e em patentes dos fabricantes de LS como constituinte do sistema peróxi-oxalato. TCPO oxida-se pela reação com H₂O₂, após mistura das soluções. O espectro de massas obtido da substância que elui em aproximadamente 51 min na figura 8 apresenta os íons com m/z 223, 225, 227 e 229 (Figura 10 A). Tais íons refletem a distribuição isotópica do cloro. O átomo de cloro é encontrado na natureza com duas massas distintas e estáveis: a massa 35 e a massa 37. A proporção entre essas massas é de aproximadamente 3 para 1. Qualquer molécula que contenha átomos de cloro em sua estrutura terá uma massa molecular correspondente à presença do ³⁵Cl e outra correspondente à presença do ³⁷Cl. Se a molécula possuir apenas 1 átomo de cloro, observaremos no espectro de massas um pico correspondente à massa M (molécula com ³⁵Cl) que é aproximadamente 3 vezes maior que um outro pico correspondente à massa M+2 (molécula com ³⁷Cl). Observaremos o par de massas na proporção 3:1. Se a molécula possuir mais de 1 átomo de cloro, precisamos considerar as diferentes combinações dos átomos de

cloro na molécula, o que altera as proporções dos picos de massa observados. Assim, no caso de 3 átomos de cloro esperamos uma distribuição isotópica correspondente às combinações M (^{35}Cl , ^{35}Cl , ^{35}Cl), M+2 (^{35}Cl , ^{35}Cl , ^{37}Cl), M+4 (^{35}Cl , ^{37}Cl , ^{37}Cl) e M+6 (^{37}Cl , ^{37}Cl , ^{37}Cl). A presença desses íons no espectro de massas nos indica que temos uma molécula com 3 átomos de cloro em sua estrutura. Não foi possível observar o íon correspondente à molécula completa do TCPO, muito provavelmente devido à instabilidade do éster e quebra da ligação no momento da ionização no espectrômetro de massas. Para confirmação, obtivemos o espectro dos fragmentos do íon m/z 223, o qual está apresentado na Figura 10 B. Obtivemos ainda o espectro de massas dos íons precursores do íon m/z 223. Nesse espectro não foi possível observar o íon m/z 446, mas o íon m/z 469 pode corresponder à molécula de TCPO cationizada com Na^+ (Figura 11). Os espectros de massas obtidos e os dados da literatura nos permitem afirmar que o éster de oxalato presente na solução interna dos *light sticks* que utilizamos em nossos experimentos é o TCPO.

Figura 10. Espectros de massas do éster de oxalato presente na solução interna de LS (tempo de retenção de 51 min na Figura 8). A) Espectro obtido em MS₁ com destaque para os íons que indicam a presença de 3 átomos de cloro na molécula. B) Espectro obtido em MS₂ com seleção dos íons fragmentos de m/z 223.

Figura 11. Espectro de massas dos íons precursores de m/z 223 correspondente ao éster de oxalato presente na solução interna de LS (tempo de retenção de 51 min na Figura 8).

Nas soluções de *light sticks*, o HPA atua como catalisador da reação e como emissor fluorescente. Moléculas com conjugação estendida podem ser oxidadas na ionização por *electrospray* do espectrômetro de massas e dar origem ao íon molecular e não ao íon correspondente à molécula protonada bastante comum nesse tipo de ionização. O espectro de massas da substância que elui em aproximadamente 63 min na figura 8 está apresentado na figura 12. Como essas moléculas são de difícil ionização, a obtenção de espectros fica prejudicada. Mesmo sendo possível observar um intenso pico na detecção por UV (figura 8), o pico correspondente na detecção por espectrometria de massas fica apenas um pouco acima do ruído. Mesmo assim, observamos o íon molecular com m/z 330 e um íon fragmento com m/z 252. Dentre os possíveis HPAs constituintes de *light sticks*, o 9,10-difenilantraceno (DPA) possui $M = 330$ Da. Sua estrutura e a do fragmento com m/z 252 estão apresentadas na figura 12. Com a suspeita de ser este constituinte o 9,10-difenilantraceno, preparamos uma solução padrão de DPA comercial e fizemos a análise da mesma forma. Houve coeluição cromatográfica com a substância

presente na solução interna do *light stick* e o mesmo espectro de massas foi obtido (dado não apresentado). A comparação desses espectros de massas com aqueles da literatura também confirma a identidade deste constituinte. Na figura 13 é apresentado o espectro de absorvância do DPA presente na solução interna do *light stick*, o qual é idêntico ao do padrão.

Figura 12. Espectro de massas indicando a presença do 9,10-difenilantraceno (DPA) na solução interna do *light stick*. O espectro foi obtido em MS_1 .

Figura 13. Espectro de absorvância do 9,10-difenilantraceno presente na solução interna do *light stick*. O espectro foi obtido a partir do pico correspondente ao HPA no sistema de HPLC/PDA.

Na Figura 14 é apresentado o cromatograma correspondente à injeção de uma alíquota da solução externa de LS no sistema de HPLC/UV/ESI-MS/MS ($\lambda = 255$ nm). Observamos que o di-n-butil-ftalato não está presente nessa solução e, com base nos dados da literatura, o provável solvente aí presente é o di-n-metil-ftalato. A substância que elui em 30 min é provavelmente o solvente. Obtivemos o seu espectro de massas em MS₁, o qual está apresentado na Figura 15. É possível observar nesse espectro o íon com m/z 195 que pode ser atribuído ao di-n-metil-ftalato. Entretanto, não realizamos a sua fragmentação para maior elucidação estrutural. Os demais íons presentes no espectro podem não ser fragmentos do íon m/z 195.

Figura 14. Solução interna do LS. A) Cromatograma obtido com detecção por UV em 255 nm no sistema de HPLC/UV/ESI-MS/MS. B) Cromatograma obtido com seleção do íon m/z 195 no sistema de HPLC/UV/ESI-MS/MS. Método descrito em Materiais e Métodos, item 3.5.

Figura 15. Espectro de massas do solvente presente na solução externa de LS (tempo de retenção de 30 min na Figura 14). O espectro foi obtido em MS_1 .

Realizamos uma série de análises cromatográficas com detecção por HPLC/UV/ESI-MS/MS das soluções de *light stick* recém misturadas, após 4, 6 e 10 dias de exposição à luz solar e do tubo coletado na praia. A comparação entre as diferentes soluções apresentada na Figura 16 mostra que alguns constituintes principais continuam presentes nas soluções após o término da reação quimioluminescente e exposição à luz solar. Um constituinte que rapidamente é modificado nessas soluções é o HPA, cujo pico já está ausente na solução após 4 dias de exposição à luz solar. Além disso, após vários dias de exposição à luz, outros constituintes começam a aparecer, sendo que a solução do tubo coletado na praia apresenta vários constituintes com significativa absorvância em 255 nm que estão ausentes nas soluções originais.

Figura 16. Soluções de *light stick* analisadas cromatograficamente após reação quimioluminescente (imediatamente após e em dias subsequentes de exposição à luz solar). Cromatogramas obtidos com detecção por UV em 255 nm no sistema de HPLC/UV/ESI/MS-MS. Método descrito em Materiais e Métodos, item 3.5.

Com a realização das análises apresentadas acima passamos a conhecer os constituintes principais das soluções que utilizamos nos experimentos que serão descritos nos itens 4.2 e 4.3. Estudos de avaliação de toxicidade de soluções contidas em *light sticks* reportados na literatura não apresentam tal caracterização e a discussão dos resultados obtidos baseia-se apenas nos dados de constituintes descritos em patentes, havendo diversas possibilidades de composição (Pinho *et al.*, 2009; Ivar do Sul *et al.*, 2009; Cesar-Ribeiro e Palanch-Hans, 2009).

4.1 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DAS SOLUÇÕES DE *LIGHT STICKS* COM BIOMOLÉCULAS *IN VITRO*

4.2.1 Formação de aduto com 2'-desoxiguanosina

A reatividade de uma molécula é devida à capacidade de grupos funcionais de sua estrutura reagirem rapidamente com nucleófilos. Esta habilidade contribui significativamente para sua toxicidade. Assim, podem reagir com grupos tióis (-SH) presentes em GSH e proteínas e grupos amino presentes em bases de DNA, proteínas (como resíduos de lisina em lipoproteínas) e nos fosfolipídios fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (Loureiro *et al.*, 2002).

Resolvemos, portanto, verificar *in vitro* se as diferentes soluções de *light stick* descritas no item 3.8 podiam modificar o nucleosídeo 2'-desoxiguanosina (dGuo), levando à formação de adutos. Dentre as soluções testadas, chamou-nos a atenção um par de produtos gerados a partir da incubação de dGuo com a solução do tubo coletado na praia (condições descritas no item 3.3).

Na figura 17 é apresentado um cromatograma com detecção por UV ($\lambda = 255$ nm) onde observamos o par de produtos da reação de dGuo com um constituinte da solução de *light stick* (incubação dGuo + *light stick* + tampão). Os produtos indicados com seta não apareceram nas incubações controles (*light stick* + tampão; dGuo + tampão) e são isômeros (possuem os mesmos espectros de massas e de absorbância).

Figura 17. Cromatogramas obtidos com detecção por UV em 255 nm no sistema de HPLC/UV/ESI-MS/MS. O espectro de absorbância do aduto obtido por HPLC/PDA está também apresentado. Método descrito em Materiais e Métodos, item 3.3.

A caracterização do aduto formado entre a solução de *light stick* (bastão coletado na praia) e dGuo é um passo importante para identificarmos substâncias reativas e possivelmente genotóxicas presentes nessas soluções. Em geral, os carcinógenos são substâncias eletrofílicas ou são metabolizados para as mesmas durante o seu processo de detoxificação. Tais substâncias são atraídas por moléculas com alta densidade eletrônica, como é o caso das bases do DNA, às quais acabam se ligando e levando à formação de adutos. A base do DNA mais susceptível a esse tipo de ataque é a guanina, mas são relatados adutos formados com todas as bases. Sendo formados no DNA através de mecanismos químicos específicos, tais adutos podem levar a mutações em proto-oncogenes ou em genes supressores de tumor e iniciar o processo de carcinogênese (Loureiro *et al.*, 2002).

O resultado da reação de dGuo com solução de *light stick* foi injetado no sistema de HPLC/ESI-MS/MS para obtenção dos espectros de massas do par de produtos gerados (Figura 18). Sabemos se tratar de um aduto devido à observação da perda da desoxirribose ($[M+H-dR]^+$, m/z 292). A molécula ligada à dGuo tem massa de 140 Da. Sabemos ainda que esses adutos possuem 2 átomos de cloro, pois observamos nos espectros de massas a presença de 3 isótopos moleculares resultantes da combinação de isótopos do cloro. Os valores experimentais das porcentagens dos picos isotópicos m/z 292, 294 e 296 são, respectivamente, 100%, 65% e 10%. Para os picos isotópicos m/z 408, 410 e 412, as porcentagens encontradas são, respectivamente, 100%, 70% e 15%. Tais dados estão de acordo com os valores teóricos correspondentes à presença de 2 átomos de cloro (100%, 63,96% e 10,23% para os isótopos 70, 72 e 74 da molécula Cl_2). Para caracterização estrutural, obtivemos espectros de massas após indução de fragmentação dos íons m/z 408, 410, 292, 294, 274 e 246 (Figura 19). A análise desses espectros nos permitiu sugerir a estrutura do aduto apresentada na Figura 20 juntamente com as estruturas dos fragmentos observados nos espectros de massas.

Figura 18. Espectro de massas obtido em MS₁ do aduto resultante das incubações de solução de *light stick* coletado em praia com dGuo.

Figura 19. Espectros de massas obtidos em MS_2 a partir das fragmentações induzidas por colisão dos íons m/z 408, 410, 292, 294, 274 e 246 do aduto resultante das incubações de solução de *light stick* coletado em praia com dGuo.

Figura 20. Estrutura sugerida para o aduto resultante das incubações de solução de *light stick* coletado em praia com dGuo. Os fragmentos apresentados foram observados nos espectros de massas de fragmentação induzida por colisão dos íons m/z 408, 410, 292, 294, 274 e 246.

Para confirmação da estrutura sugerida acima, foi necessário purificar quantidade suficiente do par de adutos (pelo menos 500 μg) para obtenção de espectros de ^1H RMN. Testamos diferentes condições de incubação, variando pH (de ácido a básico), solvente (mistura de acetonitrila e tampão nas incubações para solubilizar melhor a solução de *light stick*), volume de tampão e tempo de reação na tentativa de melhorar o rendimento. Observamos que na ausência de tampão a reação não ocorre, que na presença de acetonitrila há um desfavorecimento da reação, e que o pH neutro (pH 7,4) foi ligeiramente melhor que o ácido (pH 4) e básico (pH 11) para a formação do par de adutos. No período de 24 h de incubação com dGuo em pH 7,4 utilizando-se a proporção tampão/*light stick* de 4:1 observamos um aumento gradativo da área do pico do par de adutos (Figura 21). Realizamos ainda incubações com soluções de *light sticks* de colorações diferentes coletadas na praia. Observamos a formação dos adutos com as diferentes soluções, o que indica que um constituinte comum dessas soluções dá origem à lesão. Um dos constituintes comuns que apresenta átomos de cloro em sua estrutura é o TCPO. Como só observamos a formação dos adutos com as soluções de *light sticks* coletados na praia, é possível que produtos de degradação do TCPO sejam reativos. O fato de ser necessária a presença de volume de tampão pelo menos 4 vezes maior que o volume de solução de *light stick* para que a reação ocorra de forma mais eficiente nos mostra que o produto reativo é solúvel em água e que durante a incubação ocorre uma extração seletiva desse constituinte para a fase aquosa, favorecendo a reação.

Figura 21. Cinética de formação do aduto dGuo-*light stick* em função do tempo de incubação (800 μL tampão fosfato 50 mM, pH 7,4, contendo 1 mg de dGuo, e 200 μL de solução de *light stick*, 37 °C). Detecção por absorvância em 255 nm.

Realizamos, portanto, diversas incubações utilizando as melhores condições encontradas para a formação dos adutos, visando a purificação de quantidade suficiente para obtenção dos espectros de ^1H RMN, como descrito no item 3.3 de Materiais e Métodos. Como o rendimento da reação é baixo (aproximadamente 1%), purificamos o par de adutos a partir de 50 incubações totalizando a massa de 60 mg de dGuo incubada. A purificação foi feita utilizando-se o sistema de HPLC/PDA descrito no item 3.2.1 com a condição cromatográfica detalhada no item 3.3. Um cromatograma do par de adutos purificado está apresentado na Figura 22.

Figura 22. Cromatograma obtido pelo sistema HPLC/PDA ($\lambda = 255$ nm) com injeção de uma alíquota do aduto purificado. Método descrito em Materiais e Métodos, item 3.3.

No espectro de ^1H RMN observamos os sinais dos prótons correspondentes ao açúcar e à base guanina com os deslocamentos químicos e multiplicidades esperados de acordo com dados anteriores obtidos para outros adutos de dGuo (Hermida *et al.*, 2006). Além dos sinais desses prótons, identificamos quatro sinais com deslocamentos químicos e multiplicidades esperados para os prótons da cadeia lateral sugerida para o aduto dGuo-*light stick* (Tabela 5). Entretanto, devido à diluição da amostra, os acoplamentos esperados não foram observados no espectro de ^1H - ^1H COSY, o qual precisa ser novamente adquirido.

Tabela 5: Deslocamentos químicos no espectro de ^1H RMN do aduto dGuo-light stick em $\text{DMSO}-d_6^{a, b}$

δ (ppm)		
H-1'	6,09 - 6,13	m
H-2"	2,20 – 2,30	m
H-3'	4,34	m
H-4'	3,79 – 3,82	m
H-5'	3,54 – 3,57	m
H-5"	3,47 – 3,52	m
OH-3'	5,39	s (largo)
H-8	7,96	s
N^2 -H	7,58	s (largo)
NH-1	6,46	s (largo)
H-10	7,72	d
H-11	5,25 – 5,28	m (dd)
H-12	4,90 – 4,94	m
3H-13	1,25	d

^a m, multiplete; t, triplete; d, dublete; s, singlete; dd, duplo dublete

^b espectros adquiridos em um espectrômetro de RMN DRX 500

Os dados espectroscópicos obtidos para o aduto dGuo-*light stick* sugerem fortemente que possuímos a lesão apresentada na tabela 5.

Investigamos adicionalmente se a lesão observada nas incubações com dGuo *in vitro* pode ser formada em DNA incubado *in vitro* com solução de *light stick*, segundo o procedimento descrito no item 3.6. Para isso, após hidrólise enzimática, uma alíquota do DNA foi injetada no sistema de HPLC/UV/ESI-MS/MS com monitoramento de íons selecionados utilizando a função MRM, como descrito no item 3.6. Na Figura 23 é apresentado o cromatograma com detecção por absorvância onde são indicados os nucleosídeos normais nas amostras de DNA analisadas. Para evitar a entrada dos nucleosídeos normais no espectrômetro de massas e facilitar a detecção do par de adutos, utilizamos uma válvula que permitiu a entrada no espectrômetro de massas apenas da fração eluída entre 12 e 17 min na cromatografia. Nas condições cromatográficas utilizadas o padrão do aduto

dGuo-*light stick* eluiu em aproximadamente 15 min. As amostras de DNA foram analisadas com monitoramento de reação múltipla (MRM) selecionando-se as seguintes fragmentações: m/z 408 $\rightarrow$ m/z 292, m/z 292 $\rightarrow$ m/z 246, m/z 410 $\rightarrow$ m/z 294. Os cromatogramas com detecção por MRM estão apresentados na Figura 24, nos quais observamos a presença do par de adutos nas incubações de DNA com solução de *light stick* coletado em praia.

Figura 23. Cromatogramas obtidos com detecção por UV em 260 nm de amostras de DNA injetadas no sistema de HPLC/UV/ESI-MS/MS descrito no item 3.6.

Figura 24. Cromatogramas obtidos com detecção por espectrometria de massas (MRM) de amostras de DNA injetadas no sistema de HPLC/UV/ESI-MS/MS descrito no item 3.6. Foram selecionadas as fragmentações m/z 408 $\rightarrow$ m/z 292, m/z 292 $\rightarrow$ m/z 246, m/z 410 $\rightarrow$ m/z 294. Para comparação do tempo de retenção é também apresentado o cromatograma do padrão do par de adutos.

A observação da presença do pico correspondente ao aduto nas três fragmentações selecionadas no espectrômetro de massas nos permite afirmar que o aduto é formado em DNA incubado com solução de *light stick* *in vitro*. Observamos também que maior sensibilidade na detecção foi obtida quando selecionamos a fragmentação m/z 292 $\rightarrow$ 246. O pico correspondente ao aduto não apareceu nas análises de DNA controle. A análise da presença de adutos específicos em DNA só é possível quando possuímos padrões isolados e caracterizados desses adutos. Conseguimos, portanto, observar que a guanina presente no DNA é alvo de ataque pela substância reativa presente em soluções de *light sticks* coletados em praia. As demais bases também podem ser modificadas pela mesma substância, sendo necessária a caracterização desses outros possíveis adutos para posterior identificação de sua formação em DNA.

O estudo que realizamos nos permitiu identificar a presença de uma substância reativa em soluções de *light sticks* coletados em praia. A caracterização do aduto formado com dGuo e o conhecimento da composição das soluções de *light sticks* que utilizamos nos permitem afirmar que a substância reativa é um produto de degradação do TCPO utilizado na reação quimioluminescente. Outras substâncias reativas podem fazer parte dessas soluções e novos estudos são necessários para sua identificação.

4.2.2. Reação com albumina

Além da possibilidade de indução de lesões em DNA, verificamos que constituintes das soluções de *light sticks* coletados na praia se ligam à albumina, levando ao aumento de sua massa, como apresentado na Figura 25. Quando utilizamos maiores concentrações das soluções de *light stick* tivemos maior aumento da massa da albumina, até um limite que pode ser devido à diminuição da solubilidade das soluções de *light stick* na solução de albumina com o aumento dos volumes utilizados (condições descritas no item 3.7).

Essa observação nos indica a possibilidade de grande reatividade dessas soluções também com proteínas, o que pode ser muito prejudicial em sistemas biológicos, podendo levar as células à morte ou a modificações em suas funções normais, contribuindo para o desenvolvimento de doenças.

Figura 25. Alteração da massa da albumina em incubações com diferentes concentrações das soluções de *light-stick* amarelo e vermelho. Análise por MALDI/TOF/MS (item 3.7).

4.3 AVALIAÇÃO DE EFEITOS EM CÉLULAS EM CULTURA

A observação da reatividade de soluções de *light sticks* com biomoléculas *in vitro* nos levou a investigar a citotoxicidade e genotoxicidade dessas soluções utilizando como modelo experimental a linhagem de carcinoma hepatocelular humano HepG2.

Células HepG2 possuem enzimas de biotransformação de fase 1 e fase 2 ativas, incluindo diferentes isoenzimas de citocromo P450, epóxido hidrolase, peroxidase, citocromo P450 redutase e glutathione-S-transferase. Tal atividade enzimática é, no entanto, menor que em fígado humano normal. Devido à sua capacidade de ativação/detoxificação, essa linhagem celular é largamente utilizada em estudos de genotoxicidade e citotoxicidade de vários procarcinógenos, incluindo HPAs, nitrosaminas, aflatoxinas e aminas heterocíclicas aromáticas. A possibilidade de biotransformação endógena de xenobióticos oferecida pelas células HepG2 faz com que este seja um sistema adequado para avaliação da toxicidade de substâncias promutagênicas *in vitro* (Knasmüller *et al.*, 1998). É sugerido que a análise de múltiplos *endpoints* em células HepG2 pode prever a hepatotoxicidade de substâncias com 80% de sensibilidade e 90% de especificidade. Essa linhagem possui ainda a vantagem de ser facilmente cultivada, ser estável e derivada de humano (Noor *et al.*, 2009).

A exposição de indivíduos às soluções de *light sticks* ocorre através de contato com a pele e por ingestão. Além da toxicidade no local de contato, as substâncias podem ser absorvidas e exercer toxicidade sistêmica. Como mencionado anteriormente, tais soluções contêm substâncias solúveis e insolúveis em água. As substâncias solúveis em água podem facilmente se particionar no sangue e ser distribuídas para outros tecidos. As insolúveis em água podem se ligar a proteínas plasmáticas e também chegar a outros tecidos, de acordo com o seu conteúdo lipídico. Substâncias organocloradas têm sido retiradas de uso devido à sua característica de bioacumulação. Um dos constituintes das soluções de *light sticks* é um organoclorado (TCPO) que gera um produto de degradação reativo *in vitro*, como verificamos neste trabalho, mas sua toxicocinética é desconhecida. Neste estudo utilizamos as células HepG2 por ser este um modelo relativamente completo, comparado a outras linhagens celulares, para avaliação de toxicidade *in vitro*, como descrito acima.

4.3.1. Avaliação da Citotoxicidade das Soluções de Light Stick

Como apresentado acima, as soluções utilizadas em sinalizadores luminosos são constituídas por substâncias que pertencem a classes de compostos amplamente descritas na literatura como indutores de efeitos tóxicos. Apesar de não existirem estudos com a mistura de constituintes dos *light sticks* relacionados à exposição humana, é possível imaginar que a exposição de indivíduos a essas soluções pode aumentar o risco do desenvolvimento de doenças. Uma vez que tal exposição é totalmente desnecessária, é importante que os indivíduos sejam adequadamente alertados quanto ao risco que tais substâncias oferecem à sua saúde para que possam evitá-la. Em geral, nas embalagens dos *light sticks* é mencionado que o composto não é tóxico (Figuras 26 e 27), o que acaba afastando da população a preocupação relacionada ao uso indevido.

Figura 26. Fotografia da embalagem de *light stick* destacando a informação de que o produto não é tóxico.

PARA ATIVAR
SIMPLESMENTE
DOBRE • QUEBRE • AGITE

IMPORTANTE

manter
fechado o invólucro de alumínio
até o uso. Não perfure o tubo
plástico. Os ingredientes em
Sticks não são tóxicos e não
causam danos aos olhos, mas
podem causar desconforto
temporário, em caso de contato
com os olhos enxaguar com
água.

Figura 27. Fotografia da embalagem de *light stick*. Informação fornecida pelo fabricante de que o produto não é tóxico.

Nas duas figuras acima há informação prestada pelo fabricante de que o produto não é tóxico. Essas são algumas das várias informações constatadas em diferentes embalagens por nosso grupo. Como a maioria desses produtos é de origem estrangeira, com países fabricantes como Coreia, México, Taiwan e China, as informações estão no idioma inglês. Isto agrava a situação de usuários não conhecedores desse idioma. Como descrito na Introdução, além dos usuários moradores do litoral brasileiro que recolhem os bastões fora da embalagem (descartados no mar e praia), pessoas frequentadoras de festas também entram em contato com as soluções de *light sticks*.

Realizamos ensaios para avaliação da citotoxicidade das soluções de *light sticks* (interna, externa, recém misturada e coletada na praia, descrição no item 3.8 de materiais e métodos) em células HepG2.

Através do ensaio do corante cristal violeta verificamos que as soluções de *light stick* interna, externa, recém misturada e coletada na praia induziram morte celular de forma dose-dependente no intervalo de concentrações testado (0,0125 –

0,12% por poço contendo 5×10^4 células) pelo período de 16 horas (Figura 28). A solução externa levou à morte das células em concentrações superiores a 0,025%. Tais observações sugerem que os constituintes tóxicos das soluções de *light sticks* estejam aí presentes em concentrações muito altas (0,0125% das soluções que contêm di-n-butil-ftalato, TCPO e difenilantraceno provocaram morte de pelo menos 60% das células). Mesmo as soluções de tubos coletados em praias, nas quais os constituintes já sofreram uma série de modificações devido à exposição ao sol e ao tempo decorrido desde a reação, mostraram-se muito tóxicas.

Figura 28. Análise da citotoxicidade de soluções de *light sticks* em células HepG2 utilizando o ensaio do corante cristal violeta. Valores expressos relativos ao controle (células HepG2, 100%). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicata. Solução recém: solução interna e externa homogeneizadas imediatamente antes do ensaio (ocorrida a reação quimioluminescente). Solução oxidada: conteúdo de bastão coletado na praia. Solução interna: contém 9,10-difenilantraceno (DPA), di-n-butil-ftalato e o éster de oxalato TCPO. Solução externa: contém H_2O_2 , dimetil-ftalato e salicilato de sódio. As concentrações utilizadas estão no intervalo 0,0125 – 0,12% por poço contendo 5×10^4 células. Os valores foram considerados significativos em relação ao controle pela análise do teste t: * refere-se a $p < 0,01$ e ** a $p < 0,05$.

De fato, dados de concentrações dos constituintes de *light sticks* encontrados em patentes são os seguintes: H_2O_2 (200 mM a 15 M), éster de ácido oxálico (1 mM a 1,5 M), HPA (1 a 10 mM) e salicilato de sódio (100 μ M a 1 mM), solubilizados em

ésteres de ftalato (Rauhut *et al.*, 1968; Kennerly *et al.*, 1970; Ridgefield *et al.*, 1971; Maulding, 1975; Richter *et al.*, 1976; Zandt, 1977; World, 1985).

Outros estudos de avaliação de toxicidade de soluções contidas em *light sticks* reportados na literatura apresentam resultados semelhantes, apesar de serem utilizados outros sistemas experimentais. Em um dos estudos foi verificada toxicidade de solução de *light stick* coletado em praia para 50% de embriões de ouriço do mar na concentração de 0,0285% em água do mar (CE50). Em um estudo em que foi avaliada a toxicidade para *Artemia*, a concentração letal de solução de *light stick* coletado em praia para 50% dos indivíduos foi de 0,0063% (Cesar-Ribeiro e Palanch-Hans, 2009; Pinho *et al.*, 2009).

Avaliando-se os resultados da Figura 28, os constituintes comuns das soluções que induziram maior porcentagem de morte celular são TCPO e di-n-butil-ftalato (presentes nas soluções recém, oxidada e interna). A solução oxidada não contém mais difenilantraceno, como apresentado anteriormente na Figura 16. Apesar de a solução externa conter H_2O_2 em alta concentração dissolvido em dimetil-ftalato, a indução de morte celular é menor.

Procurando obter mais dados quanto à ação citotóxica das soluções de *light stick*, realizamos adicionalmente o ensaio do XTT (Figura 29). Esse ensaio permite uma avaliação geral da atividade de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, as quais reduzem o sal tetrazólio (XTT) para o derivado formazan solúvel de coloração laranja que é quantificado espectrofotometricamente. Foi possível observar que, apesar de 0,0125% da solução de *light stick* recém misturada provocar morte de 60% das células (verificada no ensaio do cristal violeta, Figura 28), essa morte não foi acompanhada por diminuição da atividade de enzimas mitocondriais (verificado no ensaio do XTT, Figura 29). Essa diminuição foi observada para as concentrações maiores e também nos casos das incubações com as soluções interna e coletada na praia (oxidada). Quanto à solução externa, observamos para as concentrações de 0,0125% a 0,05% uma indução de geração do formazan solúvel. Tal efeito não foi acompanhado pelo aumento do número de células (Figura 28), podendo ser devido a um aumento da atividade de enzimas mitocondriais favorecendo a redução do sal tetrazólio em formazan. Alterações mitocondriais podem mediar diferentes mecanismos de morte celular, a qual pode ocorrer por apoptose ou necrose, dependendo das concentrações dos toxicantes.

Figura 29. Análise da citotoxicidade de soluções de *light sticks* em células HepG2 utilizando o ensaio do XTT. Valores expressos relativos ao controle (células HepG2, 100%). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicata. Solução recém: solução interna e externa homogeneizadas imediatamente antes do ensaio (ocorrida a reação quimiluminescente). Solução oxidada: conteúdo de bastão coletado na praia. Solução interna: contém 9,10-difenilantraceno (DPA), di-n-butil-ftalato e o éster de oxalato TCPO. Solução externa: contém H_2O_2 , n-metilftalato e salicilato de sódio. As concentrações utilizadas estão no intervalo 0,0125 – 0,12% por poço contendo 5×10^4 células. Os valores foram considerados significativos em relação ao controle pela análise do teste t, o asterisco indica $p < 0,01$.

Uma avaliação toxicológica da natureza de morte celular foi abordada em 1997 por Raffray e Cohen. Em revisão, os autores definiram a necrose como um processo de morte celular pela falência da homeostase após grandes lesões celulares, e a apoptose como a morte celular ocorrida através de estímulos fisiológicos ou patológicos. A apoptose, um processo ativo organizado e regulado por eventos bioquímicos, incluindo transdução de sinal intracelular, ordena a cascata enzimática e a eliminação das células alvo. Nas células que morrem por apoptose, o conteúdo celular continua isolado nos corpos apoptóticos, que são removidos por macrófagos, limitando a inflamação. Já a morte celular por necrose está associada à perda precoce da integridade da membrana, levando à falência da homeostase

interna, o que consequentemente leva à liberação do conteúdo citoplasmático para o espaço extracelular, e resulta em respostas inflamatórias nos tecidos circundantes (Raffrary e Cohen, 1997; Lim *et al.*, 2010). Isto representa um ponto chave para o contraste com a apoptose, em que a conservação da integridade da membrana permite supressão das células fagocíticas sem alterações pró-inflamatórias. A fisiopatologia necrótica envolve aumento inespecífico da permeabilidade da membrana e eventual rompimento físico das membranas, tudo levando a uma multiplicidade de anomalias bioquímicas e estruturais.

Necrose e uma posterior resposta inflamatória têm sido sugeridas como potentes promotores de tumor, induzindo o crescimento tumoral, angiogênese e invasão (Lim *et al.*, 2010).

Soud-Mensi e colaboradores utilizaram diversos *endpoints* para verificar a resposta genotóxica e citotóxica da toxina marinha ácido ocadaico em diferentes linhagens de células. Dentre os ensaios, foi utilizada a medida do extravasamento da enzima lactato desidrogenase para a verificação da integridade da membrana plasmática. Assim, a citotoxicidade foi medida pelo extravasamento da LDH no meio de cultura. Os autores apontaram que a liberação da LDH ajuda a estimar a necrose (Soud-Mensi *et al.*, 2008).

O ensaio da enzima lactato desidrogenase (LDH), que permite analisar a integridade da membrana plasmática, foi realizado e os resultados estão apresentados na Figura 30.

É possível observar que 0,0125% μL da solução de *light stick* recém misturada não levou ao aumento significativo da atividade da enzima LDH no meio extracelular (Figura 30). Tal fato indica que a morte celular observada na Figura 28 para essa solução não ocorreu por necrose. A maior concentração da solução de *light stick* recém misturada (0,12%) levou, entretanto, ao rompimento da membrana plasmática. O mesmo ocorreu para as soluções oxidada e interna. Para a solução externa não houve rompimento da membrana plasmática em nenhuma concentração testada. Dessa forma, a morte observada para tais concentrações testadas no ensaio do cristal violeta (Figura 28) não ocorre por necrose. Ensaio para avaliação de apoptose precisam ser realizados.

Figura 30. Análise da citotoxicidade de soluções de *light stick* em células HepG2 utilizando o ensaio da enzima lactato desidrogenase (LDH), empregado para verificar a integridade da membrana plasmática. Valores expressos relativos ao controle positivo (células HepG2 + Triton X-100, 1%). Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em quadruplicata. Solução recém: solução interna e externa homogeneizadas imediatamente antes do ensaio (ocorrida a reação quimioluminescente). Solução oxidada: conteúdo de bastão coletado na praia. Solução interna: contém 9,10-difenilantraceno (DPA), di-n-butil-ftalato e o éster de oxalato TCPO. Solução externa: contém H_2O_2 , dimetil-ftalato e salicilato de sódio. As concentrações utilizadas estão no intervalo 0,0125% – 0,12% por poço contendo 5×10^4 células. Os valores foram considerados significativos em relação ao controle pela análise do teste t: * refere-se a $p < 0,01$ e ** a $p < 0,05$.

4.3.2. Avaliação do Dano Oxidativo em Células Incubadas com Soluções de Light Stick

Espécies reativas de oxigênio (EROs) têm sido apontadas como fatores críticos na determinação do modo de morte celular. Apesar de não estar totalmente esclarecido como EROs acionam tanto a apoptose como a necrose, a quantidade de espécies reativas parece ser crucial para determinar o tipo de morte celular. O excesso de EROs pode provocar necrose, enquanto que concentrações não tão altas podem levar à morte por apoptose (Lim *et al.*, 2010).

Os constituintes das soluções de *light sticks* podem levar à ocorrência de estresse oxidativo. HPAs e seus metabólitos podem levar à geração de EROs durante o processo de biotransformação. A indução de estresse oxidativo por HPAs favorece a oxidação de biomoléculas, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, que complementa as lesões induzidas pelos metabólitos eletrofílicos. O conjunto de lesões geradas pode comprometer a função da célula normal, desencadeando uma série de efeitos nocivos (Franco *et al.*, 2008).

EROs são também compreendidas como responsáveis pelo mecanismo de toxicidade ou patogênese de ftalatos (Hong *et al.*, 2009). Em um estudo com 960 humanos, amostras de sangue e urina foram utilizadas para mensurar os níveis de 1-hidroxipireno (1-OHP) e 2-naftol (2-NAPH) como biomarcadores de exposição a HPAs, de mono-(2-etil-5-hidroxihexil)-ftalato (MEHHP) e mono-(2-etil-5-oxohexil)-ftalato (MEOHP) para o di-(2-etil-hexil)-ftalato (DEHP) e mono-butil-ftalato (MBP) para di-butil-ftalato (DBP). O objetivo foi avaliar a exposição a substâncias ambientais e as associações entre as exposições, estresse oxidativo e sua contribuição para resistência à insulina. Os resultados mostraram que os níveis de estresse oxidativo aumentaram com a exposição às substâncias, independentemente das espécies químicas. Foi também verificado que a exposição ao bisfenol A ou ftalatos pode contribuir para resistência à insulina. A exposição a essas substâncias pode ser fator contribuinte na epidemiologia da síndrome metabólica e diabetes *mellitus* em todo o mundo através de mecanismo que envolve estresse oxidativo (Hong *et al.*, 2009).

Soluções de *light sticks* contêm, ainda, peróxido de hidrogênio e bis[2,4,6-triclorofenil]-oxalato (TCPO), que também podem contribuir para a indução de estresse oxidativo, como apresentado na Introdução.

Resolvemos, portanto, verificar se as soluções de *light sticks* ocasionam dano oxidativo nas células. Para isso, incubamos as células com concentrações 2 e 4 vezes menores que a concentração 0,0125% (menor concentração) empregada nos ensaios de citotoxicidade, buscando condições que não induzissem morte celular. Para avaliação de dano oxidativo realizamos a quantificação de 8-oxodGuo. É bem conhecido que radical hidroxila e oxigênio singlete podem atacar a base guanina no DNA e originar 8-oxodGuo e outros produtos de oxidação, além de danificar outras bases e o açúcar. Mais de 20 produtos de oxidação de desoxinucleosídeos já foram caracterizados, mas 8-oxodGuo é a lesão mais estudada, principalmente devido à sensibilidade e seletividade da detecção eletroquímica acoplada ao sistema de HPLC, geralmente utilizada para sua análise. É uma lesão mutagênica, levando principalmente a transições G:C → T:A, e considerada um indicador de dano oxidativo em DNA (Chao *et al.*, 2008). Entretanto, há muita discussão a respeito da grande discrepância dos níveis basais encontrados para essa lesão por diferentes laboratórios utilizando diferentes procedimentos de extração / hidrólise do DNA e métodos físicoquímicos. Atualmente, níveis basais no intervalo de 2 – 7 moléculas de 8-oxodGuo/ 10^7 dGuo são reportados (Mangal *et al.*, 2009). Para quantificação de lesões nessa ordem de magnitude faz-se necessário o uso de equipamentos de alta sensibilidade e seletividade. Com o intuito de conseguirmos esse nível de quantificação, temos realizado a análise de 8-oxodGuo em DNA utilizando o equipamento de HPLC/ESI-MS/MS como descrito no item 3.10.2 de materiais e métodos. O limite de quantificação para o método que utilizamos foi de 5 fmol injetando-se o padrão no sistema. Utilizamos para as análises a detecção por monitoramento de reação múltipla (MRM), selecionando-se as fragmentações 289,2 → 173,2 (padrão interno [$^{15}\text{N}_5$]-8-oxo-dGuo) e 284,2 → 168,2 (8-oxo-2'-desoxiguanosina). Na Figura 31 são apresentados os dados obtidos.

Como pode ser observado, o método utilizado permitiu a quantificação de um nível basal de 8-oxodGuo em células HepG2 que está de acordo com os mais baixos níveis já reportados na literatura para essa lesão (células controle). Tal observação nos indica que os métodos de extração e hidrólise do DNA que utilizamos em nosso laboratório são adequados para a análise. A solução de *light stick* coletado na praia (0,006%) e solução recém misturada (0,006%) induziram aumento significativo de 8-oxodGuo no DNA das células em comparação com o controle. Apesar de a solução interna não ter levado ao aumento significativo da lesão, observamos tendência a

esse aumento. Não é possível dizer qual(is) o(s) constituinte(s) que levam a esse dano oxidativo. O efeito da mistura parece ser mais importante que o efeito das soluções isoladas. De qualquer forma, os constituintes comuns presentes na solução coletada na praia e na solução recém misturada são o TCPO e o di-n-butil-ftalato.

Figura 31. Níveis de 8-oxodGuo em células HepG2 controle e incubadas com soluções de LS nas concentrações de 0,003% e 0,006%. Dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um experimento conduzido em triplicata. Solução recém: solução interna e externa homogeneizadas imediatamente antes do ensaio (ocorrida a reação quimioluminescente). Solução oxidada: conteúdo de bastão coletado na praia. Solução interna: contém 9,10-difenilantraceno (DPA), di-n-butil-ftalato e o éster de oxalato (TCPO). Solução externa: contém H₂O₂, dimetil-ftalato e salicilato de sódio. *p < 0,05 em relação ao controle (células + meio com soro).

Os dados obtidos indicam que soluções de *light sticks* contêm substâncias reativas capazes de modificar biomoléculas, o que pode explicar a grande toxicidade observada nos ensaios com células HepG2. Há carência de dados sobre a composição química das várias marcas de atratores/sinalizadores lançados por navios pesqueiros nas praias brasileiras e sobre seus efeitos tóxicos. Investigações da alergenicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade dessas soluções precisam

ser conduzidas em estudos *in vitro*, como os que estamos realizando, e *in vivo* utilizando animais experimentais. Há que se pensar e aplicar medidas de prevenção, através de programas de educação e divulgação para os grupos de risco e políticas de fiscalização e repressão desses crimes ambientais. Não se pode esquecer ainda da ampla comercialização de adereços luminosos em festas, sem qualquer preocupação com o manuseio desses materiais e seu descarte.

5 CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que:

1. Soluções contidas em tubos de *light sticks* constituídas por di-n-butil-ftalato, TCPO, difenilantraceno (solução interna), e dimetil-ftalato, H₂O₂, salicilato de sódio (solução externa) são tóxicas para células HepG2, induzindo morte significativa na concentração de 0,0125%.
2. Soluções provenientes de tubos coletados em praias possuem, além dos constituintes principais, outros que são gerados pelas reações que ocorrem com o passar do tempo na presença de luz solar
3. Constituintes de soluções de *light sticks* coletados em praias são altamente reativos, levando a modificações de biomoléculas *in vitro*
4. Com a caracterização estrutural de um par de adutos formado a partir da reação de dGuo com solução de *light stick* coletado em praia, verificamos que um dos constituintes reativos dessa solução é derivado do éster de oxalato clorado TCPO aí presente
5. Soluções de *light sticks* recém misturadas e de tubos coletados na praia na concentração de 0,006% induzem a formação de 8-oxodGuo em DNA de células HepG2
6. A alta citotoxicidade e reatividade de soluções de *light stick* verificadas neste estudo devem servir de alerta para o esclarecimento do público alvo desses utensílios quanto ao risco à saúde no caso do uso indevido dessas soluções. Por conter substâncias altamente tóxicas, esse tipo de lixo deve ser adequadamente descartado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTIN, R.; ARRIBAS, M.A.G.; BASTOS, E.L.; RÖPKE, S.; SAKAI, P.N.; SANCHES, A.M.M.; STEVANI, C.V.; UMEZU, I.S.; YU, J.; BAADER, W.J. Quimiluminescência orgânica: alguns experimentos de demonstração para a sala de aula. *Química Nova*, v.21, n.6, p.772-779, 1998.

ALMEIDA, A.M.; BERTONCINI, C.R.A.; BORECKY, J.; SOUZA-PINTO, N.C.; VERCESI, A.E. Mitochondrial DNA damage associated with lipid peroxidation of the mitochondrial membrane induced by Fe²⁺-citrate. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.78, n.3, p.505-514, 2006.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *METROCAMP Pesquisa*, v.1, n.1, p.37-58, 2007.

ARMSTRONG, D. *Oxidative stress biomarkers and antioxidant protocols*. Totowa: Human Press, 2002. p.57. (Methods in Molecular Biology, v.186).

AUGUSTO, O. *Radicais livres: bons, maus e naturais*. São Paulo: Oficina de Textos, 2006. 115p. (Inventando o futuro).

BECHARA, E.J.H.; LOUREIRO, A.P.M.; SILVA, A.L.M.; BAGATTINI, R.; STEVANI, C.V.; CAMPOS, I.P.A.; BARRETTO, F.P. Armadilhas luminosas: pesca descarta material tóxico nas praias. *Ciência Hoje*, v.43, n.257, p.42-48, 2009.

BEZERRA, F.J.L.; REZENDE, A.A.; RODRIGUES, S.J.; ALMEIDA, M.G. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como indicador da peroxidação lipídica em ratos tratados com sevoflurano. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v.54, n.5, p.640-649, 2004.

BIGGER, C.A.; PONTÉN, I.; PAGE, J.E.; DIPPLE, A. Mutational spectra for polycyclic aromatic hydrocarbons in the supF target gene. *Mutation Research*, v.450, n.1/2, p.75-93, 2000.

BOFFETTA, P.; JOURENKOVA, N.; GUSTAVSSON, P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer, Causes and Control*, v.8, p.444-472, 1997.

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

CESAR-RIBEIRO, C.; PALANCH-HANS, M.F. Light-stick - problema de saúde pública na Costa dos Coqueiros, BA. In: SEMANA NACIONAL DE OCEANOGRAFIA, 21, Belém, 2009. Resumos. Belém, 2009. Disponível em: http://www.globalgarbage.org/SNO_2009_XXI_Light.pdf. Acesso em: 10 jan. 2010.

CHAO, M. H.; YEN, C. C.; HU, C. W. Prevention of artifactual oxidation in determination of cellular 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by isotope-dilution LC-MS/MS with automated solid-phase extraction. *Free Radical Biology & Medicine*, v.44, p. 464-473, 2008.

COSTA, C.; PASQUALE, R.; SILVARI, V.; BARBARO, M.; CATANIA, S. *In vitro* evaluation oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. *Toxicology in Vitro*, v.20, p.324-331, 2006.

CUNHA, R.B.; SOUSA, M.C.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas: o papel-chave da espectrometria de massa na era pós-genômica. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, v.36, p.40-46, 2006.

CREMONESE, R.V.; PEREIRA-FILHO, A.A.; MAGALHÃES, R.; MATTOS, A.A.; MARRONI, C.A.; ZETTLER, C.G.; MARRONI, N.P. Cirrose experimental induzida pela inalação de tetracloreto de carbono: adaptação da técnica e avaliação da peroxidação lipídica. *Arquivos de Gastroenterology*, v.38, n.1, p.40-47, 2001.

CRISTALE, J.; SILVA, F.S.; MARCHI, M.R.R. Desenvolvimento e aplicação de método GC-MS/MS para análise simultânea de 17 HPAs em material particulado Atmosférico. *Eclética Química*, v.33, n.4, p.69-78, 2008.

CRUZ, S.A. *Teste de citotoxicidade in vitro como alternativa ao teste in vivo de Draize na avaliação de produtos cosméticos*. São Paulo, 2003. 103p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

DE BONT, R.; VAN LAREBEKE, N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*, v.19, p.169-185, 2004.

DRÖGE, W.; Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, v.82, p.47-95, 2002.

DUART, J.A.R.; APPELL, H.J.; CARVALHO, F.; BASTOS, M.L.; SOARES, J.M.C. Endothelium-derived oxidative stress may contribute to exercise-induced muscle damage. *International Journal of Sports Medicine*, v.14, n.8, p.440-443, 1993.

FANG, L.H.; LIN, W.C. Lipid peroxidation products do not activate hepatic stellate cells. *Toxicology*, v.253, p.36–45, 2008.

FARMER, P.B. DNA and protein adducts as markers of genotoxicity. *Toxicology Letters*, v.149, p.3–9, 2004.

FENSTER, C.P.; WEINSIER, R.L.; DARLEY-USMAR, V.M.; PATEL, R.P. Obesity, aerobic exercise, and vascular disease: the role of oxidant stress. *Obesity Research*, v.10, n.9, p.964-968, 2002.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FRANCO, S.S.; NARDOCCI, A.C.; GÜNTHER, W.M.R. PAH biomarkers for human health risk assessment: a review of the state-of-the-art. *Cadernos de Saúde Pública*, v.24, supl.4, p.S569-S580, 2008.

FREIRE, A.C.G.; AOYAMA, H.; HAUN, M.; FERREIRA, C.V. Relationship between phosphatase activity and cytotoxic effect of two protein phosphatase inhibitors, okadaic acid and pervanadate, on human myeloid leukemia cell line. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v.18, n.5, p.425–429, 2003.

FUNARI, S.S.; RAPP, G.; RICHTER, F. Double-bilayer: a new phase formed by lysophospholipids and the corresponding fatty acid. *Química Nova*, v.32, n.4, p.908-912, 2009.

GAO, D.; LUO, Y.; GUEVARA, D.; WANG, Y.; RUI, M.; GOLDWYN, B.; LU, Y. SMITH, E.C.A.; LEBWOHL, M.; WEI, H. Benzo[a]pyrene and its metabolites combined with ultraviolet: a synergistically induce 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine via reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine*, v.39, n.9, p.1177–1183, 2005.

GODSCHALK, R.W.L.; SCHOOTEN, F.J.V.; BARTSCH, H. A critical evaluation of DNA adducts as biological markers for human exposure to polycyclic aromatic compounds. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v.36, n.1, p.1-11, 2003.

GOETZ, M.E.; LUCH, A. Reactive species: a cell damaging route assisting to chemical carcinogens. *Cancer Letters*, v.266, p.73–83, 2008.

GOLDFARB, A.H.; Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise induced oxidative stress. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.25, p.232-236, 1993.

GROTTO, D.; VALENTINI, J.; BOEIRA, S.; PANIZ, C.; SANTA MARIA, L.; VICENTINI, J.; MORO, A.; CHARÃO, M.; GARCIA, S.C.; CARDOSO, S.G. Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo – malondialdeído. *Química Nova*, v.31, n.2, p.275-279, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. The definition and measurement of antioxidants in biological-system. *Free Radical Biology & Medicine*, v.18, n.1, p.125-126, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 3.ed. New York, USA: Oxford, 1998. p.897.

HERMIDA, S.A.S.; POSSARI, E.P.M.; SOUZA, D.B.; CAMPOS, I.P.A.; GOMES, O.F.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G.; LOUREIRO, A.P.M. 2'-Deoxyguanosine, 2'-Deoxycytidine, and 2'-Deoxyadenosine adducts resulting from the reaction of tetrahydrofuran with DNA bases. *Chemical Research in Toxicology*, v.19, p.927-936, 2006.

HOFFMAN, R.J.; LEWIS, S.N.; HOFFMAN, R.S. Pediatric and young adult exposure to chemiluminescent glow sticks. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, v.156, p.901-904, 2002.

HONG, Y.C.; PARK, E.Y.; PARK, M.S.; KO, J.A.; OH, S.Y.; KIM, H.; LEE, K.H.; LEEM, J.H.; HA, E.H. Community level exposure to chemicals and oxidative stress in adult population. *Toxicology Letters*, v.184, p.139–144, 2009.

HORVÁTHOVÁ, E.; SLAMEŇOVÁ, D.; MARŠÁLKOVÁ, L.; ŠRAMKOVÁ, M.; WSÓLOVÁ, L. Effects of borneol on the level of DNA damage induced in primary rat hepatocytes and testicular cells by hydrogen peroxide. *Food and Chemical Toxicology*, 47, n.6, p.1318-1323, 2009.

IVAR DO SUL, J.A. *Lixo marinho na área de desova de tartarugas marinhas do litoral norte da Bahia: consequências para o meio ambiente e moradores locais*. Rio Grande: FURG, 2005. 53p. [Trabalho de Conclusão de Curso].

IVAR DO SUL, J.A.; RODRIGUES, O.; SANTOS, I.R.; FILLMANN, G.; MATTHIENSEN, A. Skin irritation and histopathologic alterations in rats exposed to lightstick contents, UV radiation and seawater. [*Ecotoxicology and Environmental Safety*](#), v.72, p.2020-2024, 2009.

JOS, A.; PICHARDO, S.; PRIETO, A.I.; REPETTO, G.; V'AZQUEZ, C.M.; MORENO, I.; CAME'AN, A.M. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, v.72, p.261–271, 2005.

KENNERLY, G.W.; RAUHUT, M.M. *Chemiluminescent systems*. US Pat. 3,511,612, 12 maio 1970. 12p.

KEYNES, R.G.; GARTHWAITE, J. Nitric oxide and its role in ischaemic brain injury. *Current Molecular Medicine*, v.4, p.179-191, 2004.

KLEINJANS, J.C.S. Principles in toxicological risk analysis. *Toxicology Letters*, v.140/141, p.311-315, 2003.

KLEINSASSER, N.H.; KASTENBAUER, E.R.; WEISSACHER, H.; MUENZENRIEDER, R.K.; HARREUS, U.A. Phthalates demonstrate genotoxicity on human mucosa of the upper aerodigestive tract. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.35, n.1, p.9-12, 2000.

KNASMULLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; SUNDERMANN, V. M.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Research*, v.402, p.185-202, 1998.

KOO, H.J.; LEE, B.M. Human monitoring of phthalates and risk assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v.68, p.1379-1392, 2005.

KUCERA, O.; LOTKOVÁ, H.; KRIVÁKOVÁ, P.; ROUSAR, T.; CERVINKOVÁ, Z. Model systems for study of toxic injury of hepatocytes *in vitro*. *Ceskoslovenska Fyziologie*, v.55, n.3, p.103-110, 2006.

LATINI, G. Monitoring phthalate exposure in humans. *Clinica Chimica Acta*, v.361, p.20-29, 2005.

LEE, K.H.; LEEM, J.H.; HA, E.H. Community level exposure to chemicals and oxidative stress in adult population. *Toxicology Letters*, v.184, p.139–144, 2009.

LIM, S.C.; CHOI, J.E.; KANG, H.S.; SI, H. Ursodeoxycholic acid switches oxaliplatin-induced necrosis to apoptosis by inhibiting reactive oxygen species production and activating p53-caspase 8 pathway in HepG2 hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*, v.126, n.7, p.1582-1595, 2010.

LIN, W.; XU, Y.; HUANG, C.C.; MA, Y.; SHANNON, K.B.; CHEN, D.-R.; HUANG, Y.W. Toxicity of nano- and micro-sized ZnO particles in human lung epithelial cells. *Journal of Nanoparticle Research*, v.11, n.1, p.25-39, 2009.

LINDEN, R.; ANTUNES, M.A.; LAZZARETTI, C.; GAMARO, G.D. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.44, n.2, p.279-287, 2008.

LOEB, L.A.; LOEB, K.R.; ANDERSON, J.P. Multiple mutations and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.100, n.3, p.776-781, 2003.

LOUREIRO, A.P.M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagenese e carcinogenese. *Química Nova*, v.25, n.5, p.777-793, 2002.

MAFRA, D.; ABDALLA, D.S.P.; COZZOLINO, S.M.F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. *Revista de Nutrição*, v.12, n.3, p.205-212, 1999.

MANGAL, D.; VUDATHALA, D.; PARK, J.-H.; LEE, S.H.; PENNING, T.M.; BLAIR, I.A. Analysis of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in cellular DNA during oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, v.22, p.788-797, 2009.

MARNETT, L.J.; PLASTARAS, J.P. Endogenous DNA damage and mutation. *Trends in Genetics*, v.17, p.214-221, 2001.

MARQUES, S.A.; LOUREIRO, A.P.M.; GOMES, O.F.; GARCIA, C.C.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G. Induction of 1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine in DNA exposed to β -carotene oxidation products. *FEBS Letters*, v.560, p.125-130, 2004.

MAULDING, D.R. *Chlorinated bis (phenylethynyl) anthracenes as fluorescers in chemiluminescent system*. US Pat. 3,888,786, 10 jun. 1975. 6p.

MIYAMOTO, S.; RONSEIN, G.E.; PRADO, F.M.; UEMI, M.; CORRÊA, T.C.; TOMA, I.N.; BERTOLUCCI, A.; OLIVEIRA, M.C.B.; MOTTA, F.D.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO, P. Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation. *Life*, v.59, n.4/5, p.322–331, 2007.

NAKASHIMA, T.; OKADA, T.; ASAH, J.; YAMASHITA, A.; KAWAI, K.; KASAI, H.; MATSUNO, K.; GAMOU, S.; HIRANO, T. 8-Hydroxydeoxyguanosine generated in

the earthworm *Eisenia fetida* grown in metal-containing soil. *Mutation Research*, v.654, p.138–144, 2008.

NERY, A.L.P.; BAADER, W.J. Quimiluminescência de peróxidos orgânicos: geração de estados eletronicamente excitados na decomposição de 1,2-Dioxetanos. *Química Nova*, v.24, p.626-636, 2001.

NOOR, F.; NIKLAS, J.; MÜLLER-VIEIRA, U.; HEINZLE, E. An integrated approach to improved toxicity prediction for the safety assessment during preclinical drug development using HepG2 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.237, p.221-231, 2009.

O'BRIEN, P.J.; CHAN, K.; SILBER, P.M. Human and animal hepatocytes *in vitro* with extrapolation *in vivo*. *Chemico-Biological Interactions*, v.150, p.97–114, 2004.

OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 458.

OGA, S.; CARMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. *Fundamentos de toxicologia* 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 677p.

OKONA-MENSAH, K.B.; BATTERSHILL, J.; BOOBIS, A.; FIELDER, R. An approach to investigating the importance of high potency polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the induction of lung cancer by air pollution. *Food and Chemical Toxicology*, v.43, p.1103-1116, 2005.

PARK, J.H.; TROXEL, A.B.; HARVEY, R.G.; PENNING, T.M. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) α -Quinones produced by the Aldo-Keto-Reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized Pyrimidines, and 8-Oxo-dGuo via reactive oxygen species. *Chemical Research in Toxicology*, v.19, p.719-728, 2006.

PEREIRA NETTO, A.D.; MOREIRA, J.C.; DIAS, A.E.X.O. ARBILLA, G.; FERREIRA, L.F.V.; OLIVEIRA, A.S. BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) e seus derivados nitrados (NHPAS): uma revisão metodológica. *Química Nova*, v.23, n.6, p.765-773, 2000.

PIERSMA, A.H. Alternative methods for developmental toxicity testing. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v.98, p.427–431, 2006.

PINHO, G.L.L.; IHARA, P.M.; FILLMANN, G. Does light-stick content pose any threat to marine organisms? *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.27, p.155–157, 2009.

PUTNAM, K.P.; BOMBICK, D.W.; DOOLITTLE, D.J. Evaluation of eight *in vitro* assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology in Vitro*, v.16, p.599–607, 2002.

QUIROGA, B.G. Brown fat thermogenesis and exercise: two examples of physiological oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, v.13, p.325-340, 1992.

RAFFRAY, M.; COHEN, G.M. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death? *Pharmacology & Therapeutics*, v.75, n.1, p.153-177, 1997.

RAUHUT, M.M. Chemiluminescence from concerted peroxide decomposition reactions. *Accounts of Chemical Research*, v.2, n.3, p.80-87, 1969.

RAUHUT, M.M.; NORWALK, C.; LASZLO, J.B. *Generation of light by the reaction of anhydrides of oxalic acid with a peroxide in the presence of a fluorescer*. US Pat. Appl. 425,599, 14 jan. 1965, Pat 3,399,137, 27 ago. 1968. 7p.

RIDGEFIELD, H.K.W.V.; MYERS, R.L. Chemical lighting device to store, initiate and display chemical light. US Pat. Appl. 0,674,296, 10 out. 1967, Pat. 3,576,987, 04 maio 1971. 7p.

RICHTER, H.P.; HELLER, C.A.; TEDRICK, R.E. Method of producing light using catalyst chemiluminescent system. US Pat. 3,969,263, 13 jul. 1976.

SANTOS, I.R.; FRIEDRICH, A.C.; BARRETTO, F.P. Overseas garbage pollution on beaches of northeast Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v.50, p.778–786, 2005.

SICIŃSKA, P.; BUKOWSKA, B.; MICHALOWICZ, J.; DUDA, W. Damage of cell membrane and antioxidative system in human erythrocytes incubated with microcystin-LR *in vitro*. *Toxicon*, v.47, n.4, p.387-397, 2006.

SIGNORINI, J.L.; SIGNORINI, S.L. *Atividade física e radicais livres: aspectos biológicos, químicos, fisiopatológicos e preventivos*. São Paulo: Icone, EDUSP, 1993. 160p.

SILVA, A.A.R.; LOBO, I.; GUEDES, C.L.B.; PINTO, J.P. Análise de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em solos utilizando agitação ultra-sônica, tubo aquecedor/minicondensador e cromatografia gasosa. *Semina*, v.27, n.2, p.105-112, 2006.

SILVA, M.J.; SAMANDAR, E.; PREAU, J.L.; REIDY, J.A.; NEEDHAM, L.L.; CALAFAT, A.M. Quantification of 22 phthalate metabolites in human urine. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biological and Life Sciences*, v.860, n.1, p.106–112, 2007.

SINGH, R.; FARMER, P.B. Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection. *Carcinogenesis*, v.27, p.178-196, 2006.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. *Princípios de análise instrumental*. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. p.651.

SQUID-MENSI, G.; MOUKHA, S.; MOBIO, T.A.; MAAROUFI, K.; CREPPY, E.E. The cytotoxicity and genotoxicity of okadaic acid are cell-line dependent. *Toxicon*, v.51, n.8, p.1338–1344, 2008.

SOUZA Jr., T.P.; OLIVEIRA, P.R.; PEREIRA, B. Exercício físico e estresse oxidativo: efeitos do exercício físico intenso sobre a quimioluminescência urinária e

malondialdeído plasmático. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v.11, n.1, p.91-96, 2005.

SRAM, R.J.; BINKOVA, B. Molecular epidemiology studies on occupational and environmental exposure to mutagens and carcinogens. *Environmental Health Perspectives Supplements*, v.108, n.S1, p.57–70, 2000.

STEVANI, C.V.; BAADER, W.J. O sistema quimiluminescente peróxi-oxalato. *Química Nova*, v.22, n.5, p.715-723, 1999.

STRAIF, K.; BAAN, R.; GROSSE, Y.; SECRETAN, B.; GHISSASSI, F.E.; COGLIANO, V. Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Lancet Oncology*, v.6, n.12, p.931-932, 2005.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis*, v.12, p.835–840, 2007.

VANCINI, L.R.; LIRA, C.A.B.; ABOULAFIA, J.; NOUAILHETAS, V.L.A. Radical livres, estresse oxidativo e exercício. São Paulo: Centro de Estudos da Fisiologia do Exercício/UNIFESP, 2005. 10p. Disponível em: <http://www.centrodeestudos.org.br/pdfs/oxidativo.pdf>. Acesso em: 03 abr. 2008.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E.A.M.; CUNHA, D.F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M.V.M., BERNARDES, M.M.; JORDÃO JR., A.A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. *Medicina*, v.31, p.31-44, 1998. (Simpósio: Nutrição clínica, cap.III).

WAISBERG, M.; JOSEPH, P.; HALE, B.; BEYERSMANN, D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, v.192, p.95–117, 2003.

WOGAN, G.N.; HECHT, S.S.; FELTON, J.S.; CONNEY, A.H.; LOEB, L.A. Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, v.14, n.6, p.473-486, 2004.

WORLD, V.B. Method of obtaining greater lifetime duration from chemiluminescent systems. US Pat. 4,508,642, 02 abr. 1985.

XU, J.; MA, M.; PURCELL, W.M. Characterisation of some cytotoxic endpoints using rat liver and HepG2 spheroids as *in vitro* models and their application in hepatotoxicity studies. I. Glucose metabolism and enzyme release as cytotoxic markers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.189, p.100–111, 2003.

YAKOVLEVA, I.; BHAGOOI, R.; TAKEMURA, A.; HIDAKA, M. Differential susceptibility to oxidative stress of two scleractinian corals: antioxidant functioning of mycosporine-glycine. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, v.139B, n.4, p.721–730, 2004.

YASUDA, M.; OKABE, T.; ITOH, J.; TAKEKOSHI, S.; HASEGAWA, H.; NAGATA, H.; OSAMURA, R.Y.; WATANABE, K. Differentiation of necrotic cell death with or without lysosomal activation: application of acute liver injury models induced by Carbon Tetrachloride (CCL4) and Dimethylnitrosamine (DMN). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v.48, n.10, p.1331–1339, 2000.

YUAN, J.; LU, W.Q.; ZOU, Y.L.; WEI, W.; ZHANG, C.; XIE, H.; CHEN, X.M. Influence of Aroclor 1254 on Benzo (a) Pyrene-induced DNA breakage, oxidative DNA damage, and Cytochrome P4501A activity in human hepatoma cell line. *Environmental Toxicology*, v.24, n.4, p.327-333, 2008.

ZANDT, R.T.V. Chemical light device. US Pat. 4,064,428, 20 dez. 1977. 7p.