

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Investigação das rotas de biotransformação do grupo cromóforo e
avaliação toxicológica parcial dos corantes dispersos sudan III e
disperso amarelo 9**

Thalita Boldrin Zanoni
Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Investigação das rotas de biotransformação do grupo cromóforo e
avaliação toxicológica parcial dos corantes dispersos sudan III e
disperso amarelo 9**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Thalita Boldrin Zanoni
Orientadora: Danielle Palma de Oliveira

Ribeirão Preto
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Zanoni Boldrin, Thalita

Investigação das rotas de biotransformação do grupo cromóforo e avaliação toxicológica parcial dos corantes dispersos sudan III e disperso amarelo 9. Ribeirão Preto, 2010.

104 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora : Oliveira, Palma Danielle.

1.Sudan III. 2.Disperso Amarelo9. 3. Mutagenicidade

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thalita Boldrin Zanoni

Investigação das rotas de biotransformação do grupo cromóforo e avaliação toxicológica parcial dos corantes dispersos sudan III e disperso amarelo 9. Ribeirão Preto, 2010.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Danielle Palma de Oliveira

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A toda minha família.

E especialmente á minha adorável mãe e mãe científica Maria Valnice por tudo que és! E principalmente por ter me mostrado os fascínios da ciência sem a qual eu já não posso mais viver!

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela minha vida, e por toda sorte que tenho encontrado em meu caminho!

A minha avó Tereza fonte de inspiração e sabedoria.

Ao meu avô Nani pela alegria e simplicidade de viver.

À minha mãe Valnice pela fonte de inspiração.

Ao meu pai Nelson Ramos Stradiotto por todo aprendizado concedido desde a infância e pela bondade sentida a cada minuto de minha vida.

Ao meu pai Jorge Luis Zanoni pela amizade, confiança e admiração infinita.

A minha mãe espiritual Magda por ter me ensinado a desviar dos caminhos tortuosos e pelo apoio concedido durante minha vida.

A minha irmã Tessa, meu presente, por tornar a minha vida uma alegria sem fim! E por me ensinar estar só, mas acompanhada.

Ao meu namorado Gabriel pelo amor compartilhado e pelo companherismo em tudo.

Às minhas tias queridas Vanda e Carmem pelas quais tenho muito carinho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira, pela oportunidade de crescimento, pela constante atenção, amizade e exemplo profissional.

Ao Daniel pela ajuda fornecida na dissertação de modo em geral.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Alves Cardoso por ter me dado a primeira oportunidade, e pelo carinhoso modo de ensinar.

Ao meu eterno co-orientador Antonio que me mostrou os encantos da ciência.

As alunas Farah e Elisa pelos ensinamentos, apoio e disposição fornecida desde a época que eu era estagiária no laboratório.

Aos companheiros da pós-graduação Gisele, Eduardo, Rafael e Eloísa, pela convivência e momentos compartilhados.

Aos alunos do laboratório de eletroanálítica por qual tenho carinho imenso e pela facilidade e gentileza na troca de informações científicas valiosas. Especialmente ao Thiago, Thais, Juliano, Dani, Fabiana, Carolina, Michele .

Aos alunos do laboratório da Prof. Dr. Vera pelo pela solidariedade e apoio nos momentos fáceis e difíceis. Especialmente para Estela, Jú, Rodrigo, Nathalia, Francine, Leo, Natália e Daniel pelos momentos e churrascos compartilhados.

As minhas amigas irmãs Ana Beatriz, Bruna, Bárbara e Carolina pela amizade sólida e valiosa, pelos momentos de apoio, de alegrias e de tristezas.

Ao Lion pelo dócil companheirismo.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

ZANONI BOLDRIN, T. **Investigação das rotas de biotransformação do grupo cromóforo e avaliação toxicológica parcial dos corantes dispersos sudan III e disperso amarelo 9.** 2010. 104f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Corantes e pigmentos são utilizados no mundo todo para alterar a percepção visual de diversos bens de consumo. Dentre esses compostos se destacam os corantes que possuem grupamentos azo ou nitro como cromóforo. Muitas dessas substâncias são potencialmente tóxicas, seja na sua forma original seja após a biotransformação, com ênfase aos efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos. Este trabalho teve como objetivo investigar as rotas metabólicas e avaliar o perfil toxicológico parcial dos corantes Disperso Amarelo 9 e Sudan III. O Sudan III é um corante azóico e que embora tenha estrutura química muito semelhante ao Sudan I, um carcinógeno humano, existem poucos dados na literatura a respeito de sua toxicidade. Vale ressaltar que o Sudan III é um corante de alimentos banido da maioria dos países, porém tem sido repetidamente detectado em alimentos industrializados como adulterante. Já o corante Disperse Yellow 9 é amplamente utilizado principalmente pelas indústrias têxteis, porém não foram encontrados dados na literatura sobre seu potencial tóxico. Foram realizados estudos espectroeletoquímicos capazes de simular reações de oxidação e redução que ocorrem em organismos vivos, além de sistema exógeno de metabolização (S9). A mutagenicidade dos corantes foi avaliada pelo ensaio de Samonella (utilizando as linhagens TA98, TA1535, TA100 e YG1042, com e sem S9) e por meio da avaliação da capacidade de ligação com o DNA e a guanosina *in vitro*. Ainda, verificou-se a indução de morte celular em condrócitos bovinos. Nossos resultados mostraram que as condições de oxidação (eletroquímica ou após a reação com S9) e redução foram capazes de modificar o grupamento cromóforo tanto do corante Sudan III quanto do Disperso amarelo 9, e esse efeito é esperado em organismos vivos, podendo formar derivados tóxicos. O corante Sudan III é capaz de se ligar ao DNA de forma estável, mais especificamente com a base nitrogenada guanosina, enquanto o Disperso Amarelo 9 se liga fracamente ao DNA e não com a guanosina. O corante Sudan III exibiu fraca mutagenicidade e apenas com a linhagem TA1535. Por outro lado, Disperso Amarelo 9 foi positivo para as linhagens TA1535 e YG1042, e o efeito foi mais pronunciado após a ativação metabólica. Ambos os corantes induziram à morte dos condrócitos de forma tempo e concentração dependente. Assim, ambos os corantes foram considerados tóxicos, tanto na sua forma original quanto após biotransformação e podem levar a riscos à saúde humana e ao ecossistema quando de sua exposição.

Palavras-chave: Sudan III, Disperso Amarelo 9, mutagenicidade, Metabolização, Toxicidade.

ABSTRACT

ZANONI BOLDRIN, T. **Investigation of routes of biotransformation of the chromophore group and preliminary toxicological evaluation of disperse dyes sudan III and disperse yellow 9.** 2010. 104f. Thesis (Masters). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Dyes and pigments are applied worldwide to change the visual perception of many products. Among these compounds, dyes containing azo and nitro bond as chromophore are very important groups. A wide range of these substances are potentially toxic either in its original form or after biotransformation leading to mutagenic / or carcinogenic effects. The aim of the present study was to investigate the metabolic pathways involving the chromophore group and also to evaluate the toxicological profile of Disperse Yellow 9 and Sudan III dyes. Sudan III is an azo dye that has a very similar chemical structure to Sudan I a known carcinogen. Despite, there are few data about Sudan III toxicity in the literature. It is important to point out that Sudan III is banned from most worldwide food industry it has been frequently detected as an adulterant in a large amount of processed food. The literature has no information about the toxicity potential of Disperse Yellow although it is widely and mainly used by textile industries. On the present we performed a spectroelectrochemical method capable of simulating bio- reactions able to occur on living organisms such as oxidation and reduction, also exogen metabolization system (S9) were applied. The mutagenicity of the dyes was evaluated by Salmonella assay (using strains TA98, TA1535, TA100 and YG1042, with and without S9). The ability of causing stable bonds to DNA and guanosine were also tested *in vitro*. Also the capacity of inducing cell death on bovine chondrocytes was investigated. Our results indicated that the oxidation reactions (spectroelectrochemical method or after S9 reaction) and also the reduction reactions were able to modify the chromophore group for the studied dyes Sudan III and Disperse Yellow 9, this effect could be expected in living organisms and may also generate toxic products. Sudan III is capable of binding to DNA and forming stable adducts, specifically to the nitrogenated base guanosine, while Disperse Yellow 9 binds weakly to DNA and does not react with guanosine. Low mutagenicity was observed for strain TA1535 for Sudan III dye. Besides, strains TA1535 and YG1042 gave positive responses for Disperse Yellow, the effect was pronounced after metabolic activation. Death of chondrocytes was observed for both dyes demonstrating time and concentration dependency. Toxicity was observed for both dyes, before and after biotransformation, this effect may lead to risks on human health and also for the environment.

Keywords: Sudan III, Disperse Yellow 9, Mutagenicity, Metabolization, Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura dos corantes Disperso Amarelo 9 (1) e Sudam III (2), objetos de estudo neste trabalho	2
Figura 2: Estrutura química dos corantes Sudan I (a) e Sudan III (b).....	3
Figura 3. Esquema do teste <i>Salmonella</i> /microsossoma – método de pré-incubação. O número de revertentes por placa foi então avaliado utilizando-se um contador de colônias Phoenix CP600 Plus. Os testes foram feitos acompanhados da avaliação da viabilidade e da taxa de reversão espontânea das linhagens	25
Figura 4. Falange metacarpal bovina. Esta figura ilustra a cartilagem aderida ao osso.....	27
Figura 5. Espectro do corante Sudan III solubilizado em DMSO nas seguintes concentrações em ordem crescente: $2,5 \times 10^{-5}$; $3,5 \times 10^{-5}$; $4,5 \times 10^{-5}$; $5,5 \times 10^{-5}$; $6,5 \times 10^{-5}$; $7,5 \times 10^{-5}$; $8,5 \times 10^{-5}$ e 1×10^{-4} mol/L	29
Figura 6. Espectro do corante Sudan III em meio aquoso (S9-, preparado seguindo o protocolo descrito em Material e Métodos) nas seguintes concentrações: $4,5 \times 10^{-5}$ mol/L; $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L; $6,5 \times 10^{-5}$ mol/L e $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L	30
Figura 7. Espectros da solução de S9, preparado seguindo o protocolo descrito em Material e Métodos, em diferentes volumes após incubação de 1 hora e 30 minutos a 37°C na ausência do corante. Os traçados representam: (Azul escuro) 50 μL , (verde) 100 μL , (azul claro) 200 μL e (vermelho) 300 μL S9.....	31
Figura 8. (A) Espectro do corante Sudan III à $2,5 \times 10^{-5}$ mol/L antes (vermelho) e após a adição de 50 μL (verde) e 100 μL (azul) de solução de S9 e incubação por 1 hora e 30 minutos a 37°C .*(B) Perfil da solução após a filtração, com 50 μL (vermelho) e 100 μL (preto) de solução de S9	32
Figura 9. (A) Espectro do corante Sudan III á $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L antes (preto) e após a adição de 50 μL (vermelho), 100 μL (verde), 200 μL (azul escuro) e 300 μL (azul claro) da solução de S9, e incubação por 1 hora e 30 minutos a 37°C . *(B) Perfil da solução após a filtração, 50 μL (azul claro), 100 μL (vermelho), 200 μL (verde) e 300 μL (azul escuro) e 500 μL (preto) de solução de S9.....	33
Figura 10. (A) Espectro do corante Sudan III á $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L (azul claro) e após a adição de: 50 μL (vermelho), 100 μL (verde), 200 μL (azul escuro) da solução de S9, e incubação por 1 hora e 30 minutos a 37°C . (B) Perfil da solução após a filtração, 50 μL (vermelho), 100 μL (azul escuro), 200 μL (preto), 300 μL (azul claro) e 500 μL (verde) de solução de S9.....	34
Figura 11. Espectro do corante Disperso Amarelo 9 solubilizado em DMSO nas seguintes concentrações em ordem crescente: 1×10^{-5} (azul); 3×10^{-5} (verde); 5×10^{-5} (vermelho) e 1×10^{-4} mol/L(preto)	35
Figura 12: Figura mostra a solubilização do corante Disperso Amarelo 9 em S9- nas seguintes concentrações 3×10^{-5} ,(vermelho),verde 4×10^{-5} , azul escuro 5×10^{-5} , azul claro 7×10^{-5} e rosa 1×10^{-5} mol/L	35

- Figura 13.** (A) Espectro do corante Disperso Amarelo 9 á 3×10^{-5} mol/L(vermelho) e após a adição de 50 μ L (verde), 100 μ L (azul escuro), 200 μ L (azul claro) e 300 μ L (rosa) e 500 μ L (amarelo) da solução de S9, e incubação por 1 hora e 30 minutos a 37° C. *(B) Perfil da solução após a filtração, 50 μ L (verde), 100 μ L (vermelho), 200 μ L (azul escuro) e 300 μ L (azul claro) de solução de S9 36
- Figura 14.** (A) Espectro do corante Disperso Amarelo 9 á 5×10^{-5} mol/L(azul escuro) e após a adição de 50 μ L (preto), 100 μ L (vermelho), 200 μ L (verde)da solução de S9, e incubação por 1 hora e 30 minutos a 37° C. *(B) Perfil da solução após a filtração, Disperso Amarelo 9(preto) e 50 μ L (vermelho), 100 μ L (verde), 200 μ L (azul escuro) de solução de S9..... 37
- Figura 15.** (A) Espectro do corante Disperso Amarelo 9 á 1×10^{-4} mol/L(preto)50 μ L (vermelho), 100 μ L (verde), 200 μ L (azul escuro), 300 μ L (azul claro) e 500 μ L (rosa) da solução de S9, e incubação por 1 hora e 30 minutos a 37° C. *(B) Perfil da solução após a filtração, 50 μ L de S9 (azul claro), 100 μ L (vermelho), 200 μ L (preto) e 300 μ L (azul escuro) e 500 μ L(verde) 38
- Figura 16.** Espectro de absorção na região UV-Vis para solução $5,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ do corante Sudan III em DMF/THF 0,01mol L⁻¹ 39
- Figura 17.** Espectro obtido durante a oxidação do corante Sudan III ($5,5 \times 10^{-5}$ mol/L) em DMF/THF (0,01 mol/L). Espectros registrados a cada 10 minutos de eletrólise até o tempo de 2 horas e 40 minutos sob potencial fixo de +1,5V, sendo o traçado vermelho o tempo zero de reação e os outros correspondentes à leitura a cada 10 minutos de reação..... 40
- Figura 18** – Descoloração da solução de $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L do corante Sudan III em DMF / TFBTBA sob potencial fixo de + 1,5V ($\lambda = 510$ nm)..... 40
- Figura 19.** Espectro obtidos durante a redução do corante Sudan III ($5,5 \times 10^{-5}$ mol/L) em DMF/THF (0,01 mol L⁻¹). Espectros registrados a cada 10 minutos de eletrólise até o tempo de 1 hora e 40 minutos sob potencial fixo de - 1,5V, sendo o traçado vermelho o tempo zero de reação e os outros correspondentes à leitura a cada 10 minutos de reação..... 41
- Figura 20.** Descoloração da solução de $5,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ do corante Sudan III em DMF/ TFBTBA sob potencial fixo de - 1,5V ($\lambda = 510$ nm)..... 41
- Figura 21.** Espectros obtidos durante a oxidação simultânea do corante Sudan III á ($5,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) em DMSO/ TFBTBA (0,01 mol L⁻¹). Espectros registrados a cada 10 minutos de oxidação até o tempo de 40 minutos sob potencial fixo de +1,5V: vermelho (tempo 0), verde (10minutos), azul escuro (20 minutos), azul claro (30 minutos) e lilás (40 minutos)..... 42
- Figura 22.** Espectro obtidos durante a redução simultânea do corante Sudan III á ($5,5 \times 10^{-5}$ mol/L) em DMF/THF (0,01 mol/L). Espectros registrados a cada 10 minutos de eletrólise até o tempo de 1 horas e 40 minutos sob potencial fixo de +1,5V, sendo o traçado rosa o tempo zero de reação e os outros correspondentes à leitura a cada 10 minutos de reação 43
- Figura 23** – Descoloração da solução de $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L do corante Sudan III em DMSO / TFBTBA sob potencial fixo de + 1,5V ($\lambda = 513$ nm)..... 44

- Figura 24** – Espectro do aumento da formação do radical gerado após redução do Sudan III á $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L do corante Sudan III em DMSO / TFBTBA sob potencial fixo de + 1,5V até o tempo de 40 minutos ($\lambda = 631$ nm)..... 44
- Figura 25.** Espectro de absorção na região UV-Vis para solução 3×10^{-5} mol L⁻¹ do corante Disperso Amarelo 9 em DMF/THF 0,01mol L⁻¹ 45
- Figura 26.** Espectro obtido durante a oxidação do corante Disperso Amarelo 9 (3×10^{-5} mol/L) em DMF/THF (0,01 mol/L). Espectros registrados a cada 10 minutos de eletrólise até o tempo de 1 hora e 40 minutos sob potencial fixo de +1,5V, sendo o traçado azul escuro o tempo zero de reação e os outros correspondentes à leitura a cada 10 minutos de reação..... 45
- Figura 27.** Espectro obtidos durante a redução do corante Disperso Amarelo 9 ($3,5 \times 10^{-5}$ mol/L) em DMF/THF (0,01 mol L⁻¹). Espectros registrados a cada 10 minutos de eletrólise até o tempo de 1 horas e 50 minutos sob potencial fixo de -1,5V, sendo o traçado verde escuro o tempo zero de reação e os outros correspondentes à leitura a cada 10 minutos de reação..... 46
- Figura 28.** Espectro obtidos durante a oxidação do corante Disperso Amarelo 9 ($3,5 \times 10^{-5}$ mol/L) em DMSO/THF (0,01 mol L⁻¹). Espectros registrados a cada 10 minutos de eletrólise até o tempo de 1 horas e 50 minutos sob potencial fixo de -1,5V, sendo o traçado vermelho o tempo zero de reação e os outros correspondentes à leitura a cada 10 minutos de reação 47
- Figura 29.** Espectro obtidos durante a redução do corante Disperso Amarelo 9 ($3,5 \times 10^{-5}$ mol/L) em DMSO/THF (0,01 mol L⁻¹). Espectros registrados a cada 10 minutos de eletrólise até o tempo de 2 horas e 20 minutos sob potencial fixo de -1,5V, sendo o traçado marrom o tempo zero de reação e os outros correspondentes à leitura a cada 10 minutos de reação..... 48
- Figura 30** – Descoloração da solução de 3×10^{-5} mol/L do corante Disperso Amarelo 9 em DMSO / TFBTBA sob potencial fixo de + 1,5V ($\lambda = 513$ nm) redução..... 48
- Figura 31.** Espectro do DNA em tampão fosfato pH=7,4 nas seguintes concentrações (0,015mg/mL (preto), 0,03mg/mL (verde), 0,045mg/mL (azul escuro), 0,075mg/mL (azul claro) e 0,15mg/mL (vermelho). Partindo de solução estoque de 1,5mg /mL 49
- Figura 32.** Espectro do corante Sudan III á $2,5 \times 10^{-5}$ mol/L(preto) em tampão fosfato pH= 7,4 com adições crescentes de DNA (0,015mg/mL (vermelho), 0,03mg/mL (verde), 0,045mg/mL (azul escuro), 0,075mg/mL (azul claro) e 0,15mg/mL (rosa)..... 50
- Figura 33.** Espectro do corante Sudan III á $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L (preto) em tampão fosfato pH= 7,4 com adições crescentes de DNA com adições crescentes de DNA (0,015mg/mL (rosa), 0,03mg/mL (verde), 0,045mg/mL (azul escuro), 0,075mg/mL (azul claro) e 0,15mg/mL (vermelho)..... 50
- Figura 34.** Espectro do corante Sudan III á $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L (preto) em tampão fosfato pH= 7,4 com adições crescentes de DNA (0,015mg/mL (rosa), 0,03mg/mL (vermelho), 0,045mg/mL (verde), 0,075mg/mL (azul escuro) e 0,15mg/mL (azul claro) 51

- Figura 35.** Solução de DNA em 2mL de DMSO. Partindo-se de solução estoque DNA á 1,5mg/mL têm-se: (0,015mg/mL (preto), 0,03mg/mL (vermelho), 0,045mg/mL (verde), 0,075mg/mL (azul claro) e 0,15mg/mL (azul escuro)..... 51
- Figura 36.** Espectro do corante Sudan III á $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L (azul claro) em DMSO, com adições crescentes de DNA (0,015mg/mL (rosa), 0,03mg/mL (azul claro), 0,045mg/mL (vermelho), 0,075mg/mL (verde) e 0,15mg/mL (azul escuro)..... 52
- Figura 37:** Comportamento da guanosina á 0,44mg/mL em meio aquoso..... 53
- Figura 38.** Espectro do corante Sudan III a $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L (vermelho) em DMSO e após a adição de 0,00088mg/mL (verde)..... 53
- Figura 39.** Espectro das soluções de DNA em tampão fosfato pH=7,4 nas seguintes concentrações crescentes:(0,02mg/mL(preto), 0,04mg/mL(vermelho), 0,06mg/mL(verde), 0,1mg/mL(azul escuro) e 0,2mg/mL (azul claro) .Partindo de solução estoque de 2mg/mL .. 54
- Figura 40.** Espectro do corante Disperso Amarelo 9 á 3×10^{-5} mol/L(vermelho) em tampão fosfato pH= 7,4,após a reação com concentrações crescentes de DNA: (0,02 mg/mL(azul escuro), 0,04 mg/mL(verde),0,06mg/mL(azul claro),0,1mg/mL(rosa) e 0,2mg (amarelo). Partindo de solução estoque de 2mg/mL 54
- Figura 41.** Espectro do corante Disperso Amarelo 9 á 5×10^{-5} mol/ L⁻¹ (azul escuro) em tampão fosfato pH= 7,4,e alíquotas crescentes de DNA nas seguintes concentrações: (0,02 mg/mL(azul claro), 0,04 mg/mL(rosa),0,06mg/mL(preto),0,1mg/mL(vermelho) e 0,2mg (verde). Partindo de solução estoque de 2mg/mL 55
- Figura 42.** Espectro do corante Disperso Amarelo 9 III á 1×10^{-4} mol/L(preto) em tampão fosfato pH= 7,4,e alíquotas crescentes de DNA nas seguintes concentrações: (0,02 mg/mL(vermelho), 0,04 mg/mL(verde),0,06mg/mL(azul escuro),0,1mg/mL(azul claro) e 0,2mg (rosa). Partindo de solução estoque de 2mg/mL 55
- Figura 43.** Espectro do DNA em DMSO nas seguintes concentrações crescentes: (0,02mg/mL(preto), 0,04mg/mL(vermelho), 0,06mg/mL(verde), 0,1mg/mL(azul escuro) e 0,2mg/mL (azul claro) .Partindo de solução estoque de 2mg/mL..... 56
- Figura 44.** Espectro do corante Disperso Amarelo 9 III á 3×10^{-5} mol/L(preto) em DMSO com alíquotas crescentes de DNA nas seguintes concentrações: (0,02 mg/mL(vermelho), 0,04 mg/mL(verde),0,06mg/mL(azul escuro),0,1mg/mL(azul claro) e 0,2mg (rosa). Partindo de solução estoque de 2mg/mL..... 57
- Figura 45.** Comportamento da guanosina á 1,32 mg/mL em solução aquosa..... 57
- Figura 46.** Espectro da reação do corante Sudan III a 3×10^{-5} mol/L (A), 5×10^{-5} mol/L (B) e $1,1 \times 10^{-4}$ mol /L (C), com concentrações variáveis de guanosina 58
- Figura 47.** Resultados negativos de mutagenicidade para o corante Sudan III com as linhagens TA98 e YG1042 com e sem ativação metabólica S9 (A) e com as linhagens TA100 e TA1535 com e sem ativação metabólica S9 (B) 59

- Figura 48.** Comparação do perfil de mutagenicidade do corante Sudan III, com as linhagens TA1535 e TA100 com e sem ativação metabólica S9, usando doses em escala logarítmica..... 60
- Figura 49.** Perfil de mutagenicidade do corante Sudan III, com a linhagem TA1535 com ativação metabólica S9, usando doses em intervalos estreitos..... 61
- Figura 50.** Comparação do perfil de mutagenicidade do corante Sudan III, com as linhagens TA98 e YG1042 com e sem ativação metabólica S9, usando doses em escala logarítmica..... 62
- Figura 51.** Comparação do perfil da mutagenicidade do corante Disperse Yellow9 com as linhagens TA100 e TA1535 com e sem ativação metabólica S9 usando doses em escala logarítmica..... 63
- Figura 52.** Comparação do perfil da mutagenicidade do corante Disperse Yellow9 com as linhagens TA98 e YG1042 com e sem ativação metabólica S9 usando doses em escala logarítmica..... 63
- Figura 53.** Comparação do perfil da mutagenicidade do corante Disperse Yellow9 com a linhagem TA1535 e YG1042 com e sem ativação metabólica S9 usando intervalos estreitos. Os números entre parênteses foram gerados como valores de inclinação da reta, de acordo com o modelo Bernstein et al. (1982) e representa a potência do composto..... 64
- Figura 54.** Avaliação da viabilidade celular por (A) Azul de Tripano e (B) produção de Ácido Lático pelos condrócitos usando concentrações de 0,0004 -4 mg/mL de corante Sudan III, pelo período de incubação de 1 hora a 37 °C. Análise estatística * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$ 66
- Figura 55.** Avaliação da viabilidade celular por (A) Azul de Tripan e (B) produção de Ácido Lático pelos condrócitos usando concentrações de 0,0004 -4 mg/mL do corante Sudan III, pelo período de incubação de 2 horas a 37 °C. Análise estatística * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$ 66
- Figura 56.** Avaliação da viabilidade celular por (A) Azul de Tripan e (B) produção de Ácido Lático pelos condrócitos usando concentrações de 0,0004-4 mg/mL do corante Sudan III, pelo período de incubação de 3 horas a 37 °C. Análise estatística * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$ 67
- Figura 57.** Avaliação da viabilidade celular por (A) Azul de Tripan e (B) produção de Ácido Lático pelos condrócitos usando concentrações de 0,0004-4 mg/mL do corante Sudan III, pelo período de incubação de 24 horas a 37 °C. Análise estatística * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$ 68
- Figura 58.** Avaliação da viabilidade celular por (A) Azul de Tripan e (B) produção de Ácido Lático pelos condrócitos usando concentrações de 0,002-20 mg/mL do corante Disperso Amarelo 9 pelo período de incubação de 1 horas a 37 °C. Análise estatística * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$ 69

- Figura 59.** Avaliação da viabilidade celular por (A) Azul de Tripán e (B) produção de Ácido Láctico pelos condrócitos usando concentrações de 0,002-20 mg/mL do corante Disperso Amarelo 9, pelo período de incubação de 2 horas a 37 °C. Análise estatística * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$ 69
- Figura 60.** Avaliação da viabilidade celular por (A) Azul de Tripán e (B) produção de Ácido Láctico pelos condrócitos usando concentrações de 0,002-20 mg/mL do corante Disperso Amarelo 9, pelo período de incubação de 3 horas a 37 °C. Análise estatística * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$ 70
- Figura 61.** Avaliação da viabilidade celular por (A) Azul de Tripán e (B) produção de Ácido Láctico pelos condrócitos usando concentrações de 0,002-20 mg/mL do corante Disperso Amarelo 9, pelo período de incubação de 24 horas a 37 °C. Análise estatística * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$ 70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Características genéticas das linhagens de <i>S. typhimurium</i> utilizadas no teste <i>Salmonella</i> /microsoma empregadas no presente trabalho	09
TABELA 2. Controles positivos e negativos utilizados no ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma ..	11
TABELA 3. Taxa de reversão espontânea em revertentes por placa esperada para cada linhagem de <i>Salmonella typhimurium</i> usada neste trabalho.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMSO Dimetilsulfóxido

DMF Dimetilformamida

SBMCTA Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de tabelas	ix
Lista de abreviaturas e siglas.....	x
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Corantes Dispersos	01
1.2 Aspectos Toxicológicos dos corantes Disperse Yellow 9 e Sudan III	03
1.3 Reações de oxidação de compostos químicos	05
1.4 Reações de redução de compostos químicos	06
1.5 Ensaio de mutagenicidade.....	08
1.5.1 Teste de mutagenicidade com <i>Salmonella typhimurium</i>	08
1.6 Ensaio de toxicidade dos corantes Sudan III e Disperse Yellow 9 em condrócitos	11
1.7 Ensaio Eletroquímicos	12
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Material.....	14
3.2 Métodos	19
3.2.1 Ensaio eletroquímicos e espectrofotométricos com o corante Sudan III.....	19
3.2.2 Ensaio de mutagenicidade com Salmonella	21
3.2.3 Avaliação da citotoxicidade de condrócitos	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Reação do corante Sudan III com a fração microsomal S9	29
4.2 Reação do corante Disperso Amarelo 9 com a fração microsomal S9	34
4.3 Oxidação e redução eletroquímica do corante Sudan III.....	38

4.4 Reação do corante Sudan III com o DNA e guanosina	49
4.5 Reação do corante Disperso Amarelo 9 com o DNA e guanosina.....	54
4.6 Comportamento do DNA em DMSO para Disperso Amarelo 9.....	56
4.7 Ensaio de mutagenicidade com Salmonella	59
4.8 Ensaio de Viabilidade e Toxicidade celular.....	65
4.8.1 Avaliação da morte celular pelos testes com o Azul de Tripán e pela concentração de ácido láctico para o corante Sudan III.....	65
4.8.2 Avaliação da morte celular pelos testes com o Azul de Tripán e pela concentração de ácido láctico para o corante Disperse Yellow 9	68
5. CONCLUSÕES.....	71
BIBLIOGRAFIA	73
ANEXO.....	80
APÊNDICES	81

1. INTRODUÇÃO

1.1 Corantes Dispersos

Os corantes são utilizados para mudar a percepção das cores em determinados materiais, sendo um artefato vastamente utilizado em todos os ramos industriais, tanto têxteis como alimentícios, farmacológicos e agropecuários.

A estrutura química dos corantes é formada por diferentes grupamentos químicos, com finalidades diferentes como fixar o corante à fibra, conferir a cor, entre outros. O grupo cromóforo é responsável pela cor dos compostos, sendo que para esta função, o grupamento azo é um dos mais utilizados para corantes reativos, ácidos e dispersos, e se caracteriza por um ou mais grupos (-N=N-) ligados a um átomo de carbono, sendo esta a classe mais empregada pela indústria têxtil, alimentícia e cosmética (Stolz 2001). O substituinte nitro (-NO₂) pode ser encontrado em compostos químicos diversos tais como, solventes industriais, praguicidas, preservativos de alimentos, corantes e outros xenobióticos (GUARATINI *et al.*, 2001).

A toxicidade aguda da maioria dos corantes não é muito relevante, o grande risco para as populações se deve às exposições e efeitos crônicos provocados tanto pelos corantes originais, quanto por seus produtos de biotransformação, gerados por reações de oxidação, redução, hidrólise e conjugação (HUNGER, 1994). Essas reações são catalisadas por enzimas específicas e podem gerar substâncias com propriedades carcinogênicas e mutagênicas pela formação de aminas aromáticas, N-hidroxilaminas e íons nitrênio (TSUDA *et al.*, 2000; CLAXTON, 2005; SZTANDERA, 2003). Como exemplo, pode-se citar os corantes do tipo azo para o qual a quebra desse grupo por ação de enzimas citosólicas ou microflora intestinal pode gerar aminas aromáticas potencialmente tóxicas ou carcinogênicas (CERNIGLIA *et al.*, 1982; CHEN, 2006; OHKUMA *et al.*, 1999; OSANO *et al.*, 2002).

No caso dos corantes que contém função nitro, também ocorre a conversão a aminas aromáticas por nitroredutases que são produzidas pelos mesmos microorganismos intestinais (CHADWICK *et al.*, 2000). O grupo nitro (-NO₂) pode ser reduzido três vezes, perdendo 2 elétrons (e⁻) a cada redução e liberando assim uma amina primária, que dependendo de sua estrutura química pode ser mutagênica (McLANE *et al.*, 1983).

Devido à extensa quantidade de corantes comerciais disponíveis e os escassos estudos de toxicidade, pouco se sabe a respeito dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos destes compostos. Sabe-se que as propriedades mutagênicas de corantes nitro e azo dependem da natureza da posição do substituinte no anel aromático. Pequenas mudanças na molécula podem alterar drasticamente e modificar a atividade mutagênica e o potencial carcinogênico; daí vem a importância de que cada corante lançado no mercado seja adequadamente testado (FEDERAL REGISTRER, 1989). Estudos recentes têm associado alguns destes corantes com o câncer de bexiga em humanos, alguns sarcomas, hepatocarcinomas e anomalias nucleares em experimentos com animais, e a aberrações cromossômicas em células de mamíferos (HUNGER, 1994; GIUSTI, 2003).

Dentro deste contexto, foram escolhidos para este estudo, dois corantes dispersos, o Sudam III (corante di azo) e o Disperso Amarelo 9 (corante com função nitro), cujas estruturas são mostradas na Figura 1.

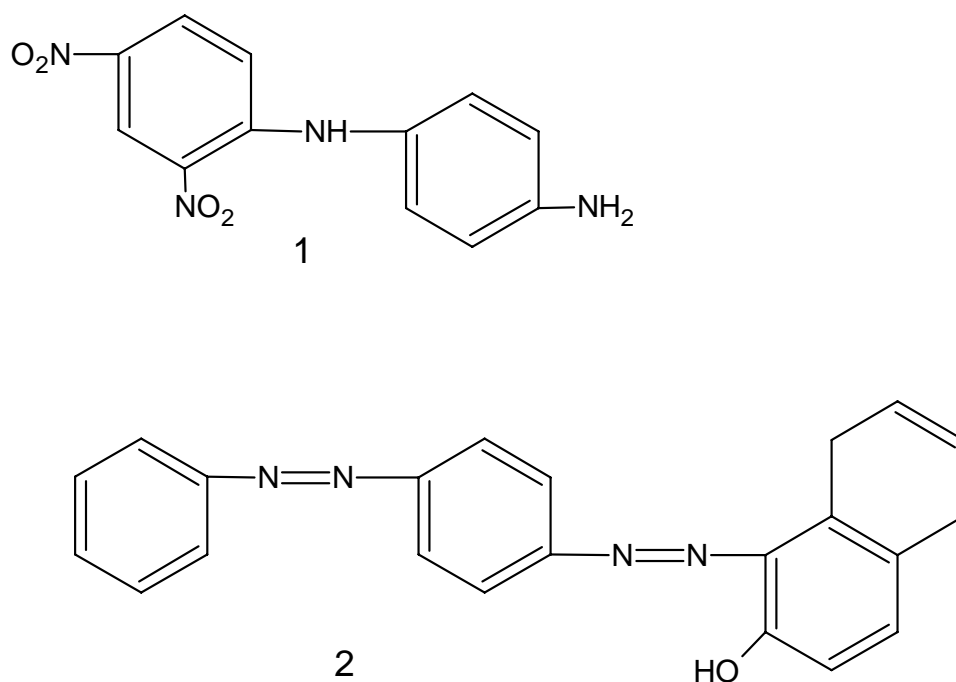


Figura 1: Estrutura dos corantes Disperso Amarelo 9 (1) e Sudam III (2), objetos de estudo neste trabalho.

1.2 Aspectos toxicológicos dos corantes Disperse Yellow 9 e Sudan III

A família dos corantes Sudan (Sudan I, II, III and IV) é composta por corantes tradicionalmente utilizados em indústrias de ceras, plásticos, óleos e tintas e alimentos, principalmente em molhos vermelhos, pois eles realçam a cor natural dos produtos (NAGASE et al, 1989; Stiborova et al, 2002). No entanto, como já citado, os corantes Sudan são reconhecidos como potente carcinógenos (Puoci et al, 2005; Stiborova et al., 2002).

Seu uso em alimentos não é autorizado, porém, notificações repetidas sobre a detecção de corantes desta classe se disseminaram rapidamente pela União Européia como um sistema de alerta desde 2003. A utilização de corantes azo da classe Sudan em alimentos destinados a consumo humano em qualquer concentração é proibida no mundo, com exceção a alguns países da África e da Ásia. Conseqüentemente a Comissão de Decisão de 2003 determinou que todas as substâncias contendo *chilli-curry* e curcuma que adentre na União Européia certifiquem-se que os produtos encontrem-se livres de corantes Sudan, pois o uso ilegal destes corantes traz conseqüências econômicas majoritárias para a maioria das indústrias alimentícias da União Européia assim também como um impacto na saúde pública (Commission Decision, 2003; Mazzetti et al.,2004).

Segundo a International Agency for Research on Cancer of the World Health Organization - IARC (Agência Internacional para a Investigação do Câncer) e o Annual Report on Carcinogens from the National Toxicology Program, NTP - US Government's (Relatório Anual do Programa de Toxicologia) o corante Sudan III esses corantes são classificados como substâncias pertencentes ao grupo 3, ou seja, substâncias para as quais não existem evidencias de indução e câncer. No entanto, o azo corante Sudan I, que possui estrutura semelhante ao Sudan III (Figura 2), é um composto comprovadamente carcinogênico para humanos (IARC, 1975; STIBOROVÁ,et.,al 2002).

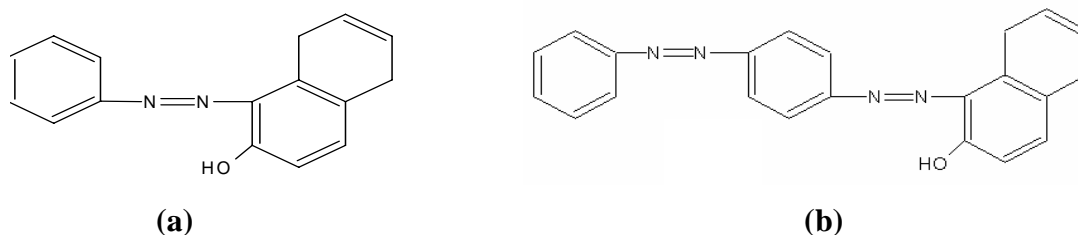


Figura 2: Estrutura química dos corantes Sudan I (a) e Sudan III (b)

De acordo com a literatura, o Sudan I pode induzir câncer em ratos e coelhos além de ser capaz de formar adutos com o DNA, principalmente em células hepáticas. Segundo dados existentes, o Sudan I é um composto clastogênico capaz de induzir a formação de micronúcleos em ratos (WESMORLAND *et al.*, 1991). Além disso, foram relatados resultados positivos para o teste de mutagenicidade com *Salmonella* para a linhagem TA1538 na presença de sistema de metabolização exógena S9 indicando que esse corante gera produtos mutagênicos após a biotransformação pelo sistema citocromo P-450 (CAMERON *et al.*, 1987, ZEIGER *et al.*, 1988a).

De acordo com STIBOROVÀ *et al.*, (2002), entre os produtos de biotransformação destacam-se os metabólitos hidroxilados capazes de se ligarem ao DNA formando mais frequentemente o aduto 8-(fenilazo)deoxiguanosina identificado em ratos. Além deste, os metabólitos formados em maior quantidade do Sudan I são os C-hidroxilados: 4'-OH-Sudan I e o 6-OH-Sudan I ambos produtos da oxidação *in vivo* e excretados pela urina (STIBOROVÀ *et al.*, 1988a; STIBOROVÀ *et al.*, 1988b). O corante Sudan I e seus produtos C-hidroxilados são também oxidados por peroxidases, e como consequência são gerados adutos no DNA, RNA e em proteínas (STIBOROVÀ *et al.*, 1989).

Em relação ao corante Sudan III, não existem muitos estudos na literatura que avaliem seu potencial mutagênico ou de seus produtos de biotransformação. O principal trabalho encontrado na literatura sobre o assunto refere-se à ação do tiosulfato de sódio como agente redutor de corantes azo em meio alcalino e detectaram a formação de benzidina, p-fenilenodiamina e anilina como principais produtos (TEIXEIRA.,2003). Existem informações na literatura sobre a preocupação de cosméticos contendo Sudan III, pois essa substância apresenta alta capacidade de sofrer clivagem metabólica por bactérias da pele podendo gerar a 4-aminoazobenzeno e a anilina (Gao et al 2007; PIELESZ et al 2002; XU-H et al 2007).

Além disso, observando-se a Figura 2, nota-se que o Sudan I é um possível produto de biotransformação do Sudan III, o que demonstra a necessidade de uma investigação mais aprofundada sobre a capacidade deste corante de causar dano ao material genético. Apesar de não existir na literatura informações sobre a mutagenicidade do Sudan III, existem muitas informações que comprovam a carcinogenicidade do Sudan I através do emprego de diversos testes, assim, devido à semelhança da estrutura química do Sudan I e o Sudan III, espera-se que este também tenha ação sobre o material genético.

Em relação ao corante Disperso Amarelo 9, poucas informações a respeito da sua toxicidade foram encontradas na literatura. De acordo com a IARC e o NTP, este corante é

classificado com grupo 2B, ou seja, possivelmente carcinogênicos (IARC, 1975; STIBOROVÁ, et al 2002).

1.3 Reações de Oxidação de compostos químicos

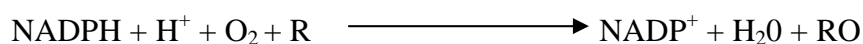
As enzimas do Citocromo P-450 constituem o grupo majoritário de enzimas de metabolização sendo classificadas em famílias, subfamílias ou membros individuais, e possuem a capacidade de catalizar reações oxidativas e redutivas de xenobióticos, com destaque aos processos de oxidação, envolvidas no metabolismo endógeno (MANSUY, 1998; GONZALEZ, 2005).

A função mais importante das enzimas do Citocromo P-450 é a de tornar as substâncias mais hidrofílicas, sendo desta forma mais facilmente eliminada. Este processo muitas vezes leva à destoxificação, no entanto, para algumas substâncias isso não ocorre, podendo ocorrer a bioativação gerando compostos mais tóxicos (NELSON *et al* 1996; WISLOCK *et al.*, 1980).

As isoenzimas do citocromo P-450 são bastante interessantes para o estudo de carcinogenicidade química e para a toxicologia, pois, a oxidação de substâncias químicas pode gerar produtos altamente reativos (CONNEY, 1982), se ligar a proteínas modificando-as ou se ligarem covalentemente ao DNA, gerando mutações (NELSON, 1994). Evidências de estudos realizados em modelos animais demonstram que as enzimas do citocromo P-450 têm um importante papel na modulação da toxicidade de compostos químicos e na indução de mutações (GUENDERICH, 1988a), no entanto para epidemiologia humana esses papéis ainda não estão claros (D'ERRICO *et al* 1996).

Todavia, sabe-se hoje que as enzimas do citocromo P-450 podem efetivamente influenciar na toxicidade de compostos em humanos e animais e atualmente foram estabelecidas algumas aproximações que podem ser usadas para substâncias presentes no meio ambiente (GUENDERICH, 1988b).

Essas enzimas são hemoproteínas que funcionam geralmente em funções mistas por reações de oxidases através da estequiometria abaixo:



A identidade do produto RO é incerta, devido às reações de rearranjos ocorridas durante o processo de oxidação. Dependendo da posição do substituinte, sabe-se que pode ocorrer aumento ou diminuição da mutagenicidade do composto formado (GUENGERICH, 1997).

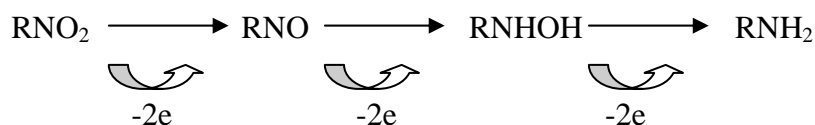
No fígado as enzimas do Citocromo P-450 (CYP) são encontradas nos hepatócitos apresentando diferentes concentrações nas variadas regiões do órgão (BARON *et al.*, 1981) e em tecidos extra-hepáticos como pulmão, rins e cérebro. Nestes locais, mesmo em concentrações muito mais baixas que no fígado as isoformas podem assumir papéis muito importantes se a especificidade ao xenobiótico for grande, ou se ocorrer contato direto com a substância, devido a rota de administração, ou quando um produto muito reativo é gerado levando a danos na própria célula (DEES *et al.*, 1982).

Em relação à metabolização do Sudan I, o CYP1A1 parece ser a principal isoforma responsável pela sua metabolização (STIBOROVÁ *et al.*, 2002).

Os corantes com estruturas químicas contendo grupos amino, são mais propensos a intensa ação de metabolismo oxidativo. O processo envolve a transferência de um elétron e pode envolver reações de hidroxilação que induz a formação de íon nitrenium ($-\text{NH}^+$), o qual pode apresentar potencialidade mutagênica ou carcinogênica devido a interações com grupos eletrofílicos das bases nitrogenadas presentes no DNA (HUNGER, 1994).

1.4 Reações de Redução de compostos químicos

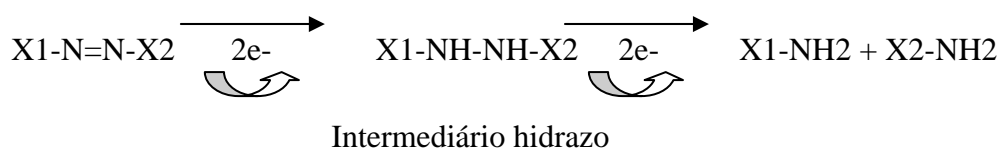
As reações de redução do metabolismo de substâncias químicas são de modo geral menos estudadas que as reações de oxidação pelo CYP. Estas reações podem gerar produtos detoxificados ou bioativados que podem ter sua toxicidade e/ou mutagenicidade alteradas. Os compostos nitro ($-\text{NO}_2$) podem sofrer três tipos de redução: 1) de $-\text{NO}_2$ a nitroso ($-\text{NO}$), hidroxilamina ($-\text{NHOH}$) e finalmente a amina primária ($-\text{NH}_2$) (MCLANE *et al.*, 1983). Estes três tipos de reações estão representados nas equações que se seguem:



A atividade das nitroredutases estão associadas a uma diversidade de enzimas tais como xantina oxidase (DE CASTRO et al., 1990; NAKAO et al.,1991), aldeído oxidase (BELISARIO *et al.*, 1990) flavoproteínas, e NADPH-CYP-450 (PERSON *et al.*, 1991) e algumas isorformas do citocromo P450, como CYP1A e CYP3A4 e CYP2B10 (CHAE *et al.*,1993; LEHMAN-MCKEEMAN et al., 1997a), conseqüentemente existem múltiplos mecanismos envolvidos na atividade de nitroredução.

A redução do grupo azo (N=N) a aminas primárias é catalisada pela porção microsomal do fígado de mamíferos CYP-450, (FUGITA; PEISACH, 1978), enzimas citosólicas (HUANG, 1979) e por bactérias (WALKER, 1980) presentes tanto na pele (COLLIER *et al.*, 1983) quanto no intestino (CHUNG *et al.*, 1992). Inúmeros corantes azo utilizados em alimentos ou encontrados como resíduos em água ou em fármacos alcançam o trato gastrointestinal, logo as bactérias como a *Clostridium*, presentes neste local e que possuem azo redutase, metabolizam os corantes azo, gerando aminas aromáticas (RAFII *et al.*, 1996).

Durante esta reação, um intermediário hidrazo pode ser formado, como mostra a equação abaixo:



Modificado de CHUNG et al., 1992.

Muitos estudos epidemiológicos indicam que a exposição a corantes que após metabolização geram a amina aromática benzidina são carcinogênicos para humanos. Um estudo conduzido por YOSHIDA *et al.*, (1971) mostrou que aplicadores desse tipo de tintas tinham 6,8 vezes mais chance de ter câncer de bexiga do que o esperado.

Assim, como não se sabe os efeitos do resultado da quebra da ligação azo, torna-se importante investigar a mutagenicidade não só dos corantes puros, mas também de seus metabólitos.

1.5 Ensaios de mutagenicidade

Uma substância é dita genotóxica quando tem a capacidade de reagir com o DNA diretamente ou após sua ativação metabólica, produzindo danos em sua estrutura e/ou função (WEISBURGER, 1999).

As mutações são definidas como sendo alterações na seqüência de nucleotídeos ou no rearranjo do DNA, e podem ser divididas em: mutações cromossômicas quando ocorrem alterações no cromossômo inteiro ou em parte dele; e mutações gênicas quando as alterações se restringem aos genes, essa ocorre quando um ou mais nucleotídeos são alterados em um organismo (THOMPSON e THOMPSON.,1993).

Neste trabalho foram utilizadas duas técnicas para avaliar a capacidade dos corantes e de seus produtos de transformação de se ligarem ao DNA: um espectrofotométrico (que será explicado em Material e Métodos, item 3) e um biológico, ensaio de mutagenicidade com *Salmonella*, descrito a seguir.

1.5.1 Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurim*

O teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*/microsoma, também conhecida como Teste de Ames é utilizado mundialmente como um teste inicial de triagem para determinar o potencial mutagênico de novas substâncias químicas, assim também como para documentação, registro ou aceitação de novas substâncias químicas que serão lançadas no mercado por agências reguladoras (MARON *et al.*,1983; MORTELMANS *et al.*, 2000).

O desenvolvimento do teste envolveu vários anos desde as pesquisas iniciais, nas quais se tentava identificar o mapa dos genes responsáveis pela biossíntese da histidina utilizando *Salmonella typhimurium*. No decorrer destas pesquisas, foi produzido grande número de mutantes dessa espécie. As mutações ocorriam no operon da histidina e se originavam espontaneamente, por radiação ou induzidas por químicos. Com isso, as bactérias não conseguiam crescer na ausência de histidina. Mais tarde observou-se que algumas dessas linhagens podiam ser usadas para identificar e caracterizar mutágenos devido à capacidade de reverter a mutação e crescer quando em contato com um mutágeno (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Logo, a recuperação da habilidade de sintetizar histidina e, portanto, de

crescer no meio de cultura indica que as substâncias responsáveis por este fenômeno provocaram mutações nas bactérias e são consideradas mutagênicas (UMBUZEIRO, 2003).

As linhagens utilizadas para o ensaio pertencem ao grupo das Enterobactérias que são capazes de produzir azoredutase e nitroredutase (PRIVAL *et al.*, 1982; PRIVAL *et al.*, 1984). Associando linhagens sensíveis, com constantes aprimoramentos nos protocolos e diferentes condições de metabolização, foi possível elevar a especificidade do teste na identificação de compostos potencialmente carcinogênicos (UMBUZEIRO, 2003).

As linhagens TA98 e TA100 são comumente utilizadas para estudos de triagem, mostrando eficiência na detecção de grandes números de agentes mutagênicos. A linhagem TA1535 faz parte da bateria mínima para análise de compostos com fins regulatórios (MORTELMANS; ZIEGER, 2000), onde a ausência do plasmídeo pKM101 diminui o sistema de reparo passível de erro (tipo error prone) aumentando tanto a mutagênese espontânea quanto a induzida (UMBUZEIRO, 2003). Além disso, linhagens com alta produção de ambas as enzimas, nitroredutase e O-acetiltransferase (YG1041 e YG1042) foram desenvolvidas. A combinação destas linhagens pode auxiliar na elucidação do papel destas enzimas na atividade mutagênica de azo corantes.

Assim, o ensaio *Salmonella*/microsoma, apesar de ser um teste bacteriano, é uma ferramenta importante capaz de prever os possíveis efeitos desses compostos para a saúde humana após ingestão, pois a *Salmonella* é uma enterobactéria, com características metabólicas similares à flora intestinal de mamíferos (OLIVEIRA, 2005; UMBUZEIRO *et al.*, 2005a).

Os genótipos das linhagens empregadas no presente estudo bem como o tipo de mutação que detectam estão mostrados na Tabela 1.

TABELA 1. Características genéticas das linhagens de *S. typhimurium* utilizadas no teste *Salmonella*/microsoma empregadas no presente trabalho.

Linhagem	Genótipo	Tipo de mutação	Referência
TA98	<i>hisD30521, rfa2, _bio3, _uvrB4, pKM101(Apr)5</i>	Deslocamento do quadro de leitura	MARON E AMES (1983)
TA100	<i>hisG461, rfa2, _bio3, _uvrB4, pKM101 (Apr) 5</i>	Substituição de pares de base	MARON E AMES (1983)
TA1535	<i>hisG461 rfa2 _uvrB4</i>	Substituição de pares de base	CETESB (1993)
YG1042	<i>hisG461, rfa2, _bio3, _uvrB4, pKM101 (Apr) 5, com alta produção de nitroredutase e O-acetiltransferase(pYG233) (Cnr)</i>	Substituição de pares de base	UMBUZEIRO E VARGAS (2003)

1 *his* mutação responsável pela síntese da histidina 4 *_uvrB* deleção do gene *uvrB*

2 *rfa* permeabilidade da membrana de lipopolissacarídeos 5 Apr ampicilina resistente

3 dependência à biotina

As linhagens de *Salmonella* possuem seqüências de bases nitrogenadas com maior possibilidade de interação com mutágenos (*hot spot*). A mutação *hisG461*, presente na TA100 e TA1535, codifica o gene para a primeira enzima de sua biossíntese (AMES, 1971) e resulta da substituição de uma leucina (GAG/CTC) por uma prolina (GGG/CCC), sendo marcador para agentes mutagênicos que causam substituição de pares de bases. Nas linhagens TA98 e YG1041 essa seqüência é constituída de oito resíduos CG (CGCGCGCG) repetitivos. Já na linhagem YG1042 essa seqüência resulta da substituição de uma leucina (GAG/CTC) por uma prolina (GGG/CCC) (MARON; AMES, 1983).

As substâncias que provocam alterações no genoma de organismos procariotos, podem ocasioná-las também no genoma humano, porque a estrutura primária do DNA é a mesma (PILOT; DRAGAN, 1998). Apesar destas semelhanças, as bactérias não apresentam a maioria das enzimas envolvidas nos processos de biotransformação que ocorrem nos mamíferos que podem gerar substâncias mais ou menos mutagênicas. Portanto, para que estes ensaios em procariotos sejam preditivos, isto é, possam detectar substâncias potencialmente mutagênicas para o homem, é importante que um sistema exógeno de metabolização seja adicionado (GOMES; CARNEIRO, 1997).

O sistema mais comumente utilizado, a fração microsomal (S9), é composto por um homogenato de células de fígado de rato Sprague-Dawley, pré-tratado com a mistura do indutor enzimático bifênol policlorinado (Aroclor 1254), que induz um aumento das enzimas (P450) neste órgão. A fração (S9) é acrescida de cofatores adequados e necessita de condições de pH específico para que as reações de metabolização possam ocorrer (MARON, AMES.,1983). Sabe-se que os seres humanos contêm cerca de 50 enzimas do CYP, dentre esses, as principais isoformas envolvidas na ativação de carcinógenos ambientais são as CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6 e CYP3A4. A CYP1A1 é ortóloga entre os seres humanos e ratos, o que valida para os humanos os resultados de testes de mutagenicidade na presença de sistemas exógenos de metabolização como a fração S9 (LANG& PELKONEN,1999).

O ensaio é feito sempre com controles negativos e positivos, de forma a assegurar a capacidade de resposta da linhagem e a eficácia do sistema de ativação metabólica (MARON,AMES,1983). O controle negativo utilizado para todas as linhagens foi o dimetilsulfóxido (DMSO). Já os controles positivos foram específicos para cada linhagem de *Salmonella typhimurium* e estão expressos na Tabela 2, juntamente com as doses empregadas.

TABELA 2. Controles positivos e negativos utilizados no ensaio Salmonella/microsossoma.

Linhagem	Controle (S9-)	Dose		Dose ($\mu\text{g/placa}$)
		($\mu\text{g/ placa}$)	Controle+(S9)	
TA1535	Azida sódica	5	2- aminoantraceno	2-10
TA98	-nitroquinolina- 1-óxido	0,5	2-aminoantraceno	5
TA100	4-nitroquinolina-1- óxido	0,5	2-aminoantraceno	2,5
YG1042	2-nitrofluoreno	10	2-aminoantraceno	2,5

Fonte: UMBUZEIRO, VARGAS, 2003

1.6 Ensaios de toxicidade dos corantes Sudan III e Disperse Yellow 9 em condrócitos

Além da ligação ao DNA, neste trabalho foi avaliada a toxicidade dos corantes pela técnica de exclusão do azul de tripano e de formação de ácido láctico em condrócitos isolados de falange metacarpal bovina de acordo com o método descrito por BURNSTEIN *et al.*, (1983). A cartilagem articular se distingue de outros tecidos, por geralmente consumir muito menos oxigênio que a maioria de outros tipos celulares (STOCKWELL, 1983). Os condrócitos geralmente derivam energia principalmente a partir da glicólise, a qual não requer oxigênio (LEE; URBAN; 1997; OTTE, 1991). O modo como eles utilizam oxigênio, ainda não é bem definido, mas sabe-se que os níveis de oxigênio presentes na cartilagem afetam o funcionamento celular, logo, sabe-se que os condrócitos podem sobreviver muitos dias sem oxigênio (GRIMSHAW, 2000). A cartilagem articular é avascular, desta forma, todos os nutrientes, incluindo o oxigênio, são suplementados aos condrócitos por difusão de locais próximos a ela, principalmente do líquido sinovial (GLOSTER, 1972; GAESSER, 1984).

O ensaio com azul de tripano é uma técnica clássica de avaliação de morte celular e tem como princípio a capacidade que as células viáveis têm não permitir a incorporação do corante azul de tripano, pois sua membrana celular está íntegra. Ao contrário, as células inviáveis cuja membrana não está íntacta, coram-se de azul devido à incorporação do corante. Ressalta-se que esta técnica detecta células inviáveis que possuem danos na membrana, mas pode não detectar células inviáveis cujos danos afetam a adesão celular ou que podem progredir para a morte celular (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH; 2003).

O método do Ácido Láctico é um ensaio colorimétrico que pode ser usado para determinar a citotoxicidade de compostos químicos. Este ácido é um produto obtido a partir do metabolismo de carboidratos, sendo desta forma útil para determinação do metabolismo de células, pois a produção do mesmo pelas células indica que estão vivas, sendo que quando ocorre diminuição da produção do ácido láctico, provavelmente ocorre morte celular (GLOSTER, 1972; GAESSER, 1984).

O ácido láctico produzido pelas células através do metabolismo celular é convertido a piruvato e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação enzimática da oxidase láctica, presente no agente revelador. Na presença do H_2O_2 formado, a enzima peroxidase presente no reagente ativa os precursores da cor presentes na amostra a formarem uma substância de cor roxa e com absorção a 540 nm; quanto mais intensa a cor formada, maior é a presença de ácido láctico, pois o aumento da absorbância na região de 540 nm é diretamente proporcional a concentração de lactato na amostra (BARHAM, 1972; TRINDER, 1969).

1.7 Ensaio Eletroquímico

O uso da eletroquímica tem sido testado tanto para investigar interações entre compostos biologicamente importantes quanto para mimetizar o comportamento redutivo ou oxidativo de moléculas complexas. Deste modo, estes ensaios podem ser utilizados para investigar o comportamento de um corante do tipo disperso e bases nitrogenadas do DNA, como realizado anteriormente por GOLKA *et al.* (2004) em estudos de interação entre bases nitrogenadas com herbicidas potencialmente carcinogênicas, ou para monitorar reações *in situ* de produtos eletroquimicamente formados durante oxidação (HARTINGER *et al.*, 2002).

Neste trabalho, os ensaios eletroquímicos foram utilizados para mimetizar as reações de oxidação e redução que poderiam ocorrer nos organismos e comparar com os resultados obtidos com a reação do S9 e os corantes *in vitro*. Para avaliação da redução e oxidação dos corantes estudados, utilizou-se uma cubeta de quartzo que atuou como uma célula eletroquímica, com eletrodos acoplados a um Potenciostato que oxidava e reduzia a solução dependendo do tipo de análise realizada. Simultaneamente, o produto gerado era medido por um espectrofotômetro.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar as rotas de oxidação e redução do grupo cromóforo e avaliar o perfil toxicológico parcial dos corantes Disperso Amarelo 9 e Sudan III.

Para tal avaliação foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- 1- Proceder as reações de oxidação e redução dos corantes Disperso Amarelo 9 e Sudan III por métodos eletroquímicos, a fim de avaliar a quebra do cromóforo ;
- 2- Investigar a ação das isorformas do citocromo P450 sobre o cromóforo dos corantes em questão, utilizando a fração microssomal S9;
- 3- Investigar *in vitro* as possíveis interações entre os corantes em questão com o DNA e a base nitrogenada específica guanosina;
- 4- Avaliar a mutagenicidade dos corantes Disperse Yellow 9 e o Sudan III, empregando as linhagens TA98, TA100, TA1535 e YG1042, com e sem ativação metabólica;
- 5- Avaliar a toxicidade dos corantes em questão utilizando-se células de tecido bovino “condrócitos”, através do teste Trypan Blue e da produção de lactato, produto de metabolização celular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Neste trabalho, foram avaliados os corantes Disperso Amarelo 9 e o Sudan III (Figura 1). Os corantes foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich e possuem as seguintes características:

Disperso Amarelo 9

CAS Reg Nr:6373-73-5

Classificação: Di-nitro

Sinonímia: C.I Solvent Orange 53, Golden Yellow IX, Seriplas Yellow PL, Solvent Orange 53, Supracet Yellow 5RD,

Sudan III

CAS Reg Nr: 85-86-9

Classificação: Di-azo

Sinonímia: Solvent Red 23, Somalia Red III.

Reagentes e materiais necessário para ensaios Químicos:

- Guanosina 5' monofosfato de sódio hidratada, Sigma Aldrich,
- Tetrafluoroborato de tetrabutilamonio(Bu_4NBF_4), 95%,(0.01 M) Achros Organics,
- Dimetilformamida, J. T. Baker,
- Dimetilsulfóxido (DMSO)- Aldrich,
- DNA bovino- Sigma
- Cubeta de quartzo volume 2mL.
- Eletrodos: fio de ouro,(eletrodo de trabalho); fio de platina(eletrodo auxiliar); eletrodo Ag/AgCl
- Capilar de Luigin,
- Potenciostato
- Espectrofotometro de arranjo de diodos HP 8453 interligado a um microcomputador HP Kayak.
- Fração microssomal de fígado de rato (S9) AROCLOR

Meios de cultura e soluções para o ensaio de mutagenicidade com Salmonella:

- Meio de Vogel Bonner (50 x): Composto por 10 g de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 91,43 g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), 500 g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), 175 g de fosfato de sódio e amônio ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e 1L de água destilada morna. Após esterilização em autoclave o meio foi estabilizado a 55°C em banho maria e estocado em refrigerador.
- Solução de glicose 10%: 20 g de glicose foram dissolvidos em 200 mL de água destilada. Após esterilização o meio foi estabilizado a 55°C em banho maria.
- Solução de Agar: 15 g de agar foram dissolvidos em 780 mL de água destilada. Após esterilização o meio foi estabilizado a 55°C em banho maria.
- Solução de biotina e histidina 0,5 mM: 0,012 g de D-biotina ($\text{MM} = 244,3 \text{ mol/L}^{-1}$) e 0,0078 g de L-histidina ($\text{MM} = 155 \text{ mol/L}^{-1}$) foram dissolvidos a quente em 100 mL de água destilada. Após esterilização em autoclave, a solução foi estocada em refrigerador.
- Agar mínimo: Este meio de cultura é composto por 200 mL de solução de glicose 10%, 780 mL de solução de agar, 20 mL de meio Vogel Bonner (50x) e 12 mL de solução de biotina e histidina 0,5 mM. Volumes de 20 mL foram distribuídos em placas de Petri previamente esterilizadas.
- Agar mínimo enriquecido: As provas genéticas foram realizadas a fim de confirmar as características genéticas das linhagens. Para tanto, foram usados o agar mínimo suplementado com biotina e o agar mínimo suplementado com biotina e excesso de histidina, preparados como se segue:
 - *Agar mínimo + biotina*: 6 mL da solução de biotina 0,5 mM foram acrescentados em 1L de Agar mínimo em substituição à solução de biotina e histidina 0,5 mM.
 - *Agar mínimo + biotina + excesso de histidina*: 6 mL da solução de biotina 0,5 mM e 10 mL de solução de histidina 26 mM foram acrescentados em 1L de agar mínimo em substituição à solução de biotina e histidina 0,5 mM.
- Solução de biotina 0,5 mM: 0,012 g de D-biotina ($\text{MM} = 244,3 \text{ mol/L}^{-1}$) foram dissolvidos a quente em 100 mL de água destilada. Após esterilização em autoclave, a solução foi estocada em refrigerador.
- Solução de histidina 26 mM: 403 mg de L-histidina ($\text{MM} = 155 \text{ mol/L}^{-1}$) foram dissolvidos em 100 mL de água destilada. Em seguida esta solução foi autoclavada e estocada em refrigerador.

- Caldo nutriente: 25 g do caldo nutriente foram dissolvidos a frio em 1L de água destilada. Volumes de 20 mL foram distribuídos em frascos com tampa de rosca e submetidos à esterilização em autoclave.
- Agar de superfície: 6 g de Bacto Agar e 5 g de cloreto de sódio (NaCl) foram dissolvidos em 1L de água destilada. Volumes de 250 mL foram distribuídos em frascos com tampa de rosca e submetidos à esterilização em autoclave.
- Agar nutriente: 25 g de caldo nutriente e 15 g de agar foram dissolvidos em 1L de água destilada. Este meio foi autoclavado, estabilizado em banho maria a 55°C e em seguida volumes de 20 mL foram distribuídos em placas de Petri previamente esterilizadas.
- Solução de ampicilina 8 mg/mL: 0,08 g de ampicilina foram dissolvidos em 10 mL de água morna. A esterilização desta solução foi feita por membrana filtrante de 0,45 µm (MILLIPORE) e em seguida a mesma foi armazenada em refrigerador em frasco escuro.
- Solução de canamicina 8 mg/mL: 0,08 g de canamicina foram dissolvidos em 10 mL de água morna. A esterilização desta solução foi feita por membrana filtrante de 0,45 µm (MILLIPORE) e em seguida a mesma foi armazenada em refrigerador em frasco escuro.
- Solução de cristal violeta 0,1%: 0,1 g de cristal violeta foi dissolvido em 100 mL de água destilada previamente esterilizada. Esta solução foi armazenada à temperatura ambiente.
- Mistura S9 – 4% v/v: Cada 100 mL de mistura S9 é composto por 39,5 mL de água destilada estéril, 50 mL de tampão fosfato 0,2 M, 4 mL de NADP, 0,5 mL de glicose-6-fosfato 1,0 M, 2 mL da solução de sais (KCl 1,65 M e MgCl₂ 0,4 M) e 4 mL de fração S9, preparadas conforme descrito abaixo. Essa solução sempre foi preparada assepticamente, em banho de gelo, seguindo a ordem dada na adição dos reagentes. Após 3 horas a solução excedente foi descartada.
- Tampão fosfato 0,2 M pH=7,4:

Solução A

2,84 g de fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) foram dissolvidos em 100 mL de água destilada.

Solução B

2,76 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em 100 mL de água destilada.

- Volumes de 88 mL da solução A e 12 mL da solução B foram misturados e o pH foi ajustado para 7,4 com a solução A ou B. Após esterilização em autoclave o tampão foi estocado em frasco escuro na temperatura ambiente.
- Solução de NADP 0,1 M: 0,7654 g de NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) foram dissolvidos em 10 mL de água destilada estéril. Esta solução foi esterilizada por membrana filtrante de 0,22 μm (MILLIPORE) e armazenada a -20°C.
- Solução de glicose-6-fosfato 1 M: 2,821 g de glicose-6-fosfato foram dissolvidos em 10 mL de água destilada estéril. Esta solução foi esterilizada por membrana filtrante de 0,22 μm (MILLIPORE) e armazenada a -20°C.
- Solução de sais (cloreto de magnésio (MgCl_2) 0,4 M; cloreto de potássio (KCl) 1,65 M: 8,13 g de MgCl_2 e 12,3 g de KCl foram dissolvidos em 100 mL de água destilada. Após esterilização em autoclave esta solução foi mantida em refrigerador.
- Fração S9: Este reagente é adquirido liofilizado, armazenado a -20°C e ressuspenso com 2,1 mL de água destilada estéril no momento do uso. A fração S9 é preparada a partir de microsomas de células de fígado de rato, tratado com o indutor enzimático Aroclor 1254 e separado por centrifugação a 9000g.
- Água de diluição

Solução A (g/L): 34 g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) foram dissolvidos em 1L de água destilada.

Solução B (g/L): 81,1 g de cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em 1L de água destilada.

Solução Final (v/v): 1,25 mL da solução A foram acrescentados à 5,0 mL da solução B e o volume completado para 1L com água destilada. 90 mL desta solução foram distribuídos em frascos de vidro com tampa de rosca e esterilizados em autoclave.

- Para os controles positivos usados no teste (4-nitroquinolina-1-óxido, 4-nitrofenileno-diamina, 2-nitrofluoreno, 2-aminoantraceno) foram preparadas soluções-mãe de 1 mg/mL em DMSO e as mesmas foram diluídas para as concentrações adequadas.

Reagentes e materiais necessários para ensaio dos condrócitos

- Bisturis de calibre 20 e 22 em álcool (70%) por 30 minutos.
- Tubo Falcon 50 mL
- Luva de aço
- Câmara de fluxo laminar
- Tábua
- Para 500 mL de DMEM: 5mL de antibiótico in vitrogen (15240-062), solução de 5M de NaCl (Sigma) + 0,2 M de KCL (Sigma)
- Patas de vaca bovina (máximo 48 horas após abatimento)
- Escova
- Bisturi não estéril calibre 20 e 22
- Balde
- Hipoclorito de Sódio
- Água destilada
- Luvas cirúrgicas
- Balança analítica METLER TOLED-AB104-S
- Colagenase (Sigma)-*Clostridiopeptidase A- Clostridium histoliticum*
- Estufa 37 graus Celsius
- Shaker
- Eppendorf estéreis
- Centrífuga ALC-PK130-CWS(COOL WORKING SYSTEM)-ANNITA III- Processing control interface
- Centrífuga de eppendorfd: Heraeus(instrument) Biofuge pico.
- Mixer de eppendorfs: Whirlmixer (Fisons)
- Autoclave Little sister 3(Autoclave/Longchamber)
- DMSO (Sigma)
- Placa de ELISA 96 poços
- Espectrofotômetro de placas
- Lactato (Trinity-Biotech)
- Ácido Lático (padrão) (Sigma)
- Micropipeta

Reagentes e materiais necessários para o ensaio do Trypan Blue.

- Corante Trypan Blue
- Hematocitômetro
- Condrócitos
- Microscópio óptico
- Estufa de 37 graus Celsius
- Câmara de fluxo laminar
- Solução de 10% Hipoclorito de Sódio
- Micropipeta volume até 1mL

3.2 Métodos**3.2.1 Ensaio eletroquímico e espectrofotométrico com o corante Sudan III e Disperso Amarelo 9**

Esta etapa do trabalho foi desenvolvida em conjunto com o Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Araraquara, sob supervisão da Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni.

Comportamento eletroquímico do corante Sudan III e Disperso Amarelo 9 em reações de oxidação e redução.

Para observar reações de oxidação e redução eletroquímicas foi montada uma célula espectroeletroquímica em uma cubeta de quartzo de 2mL, onde foram introduzidos os seguintes eletrodos: um fio de ouro (eletrodo de trabalho), um fio de platina (eletrodo auxiliar) e um eletrodo de referência de Ag/AgCl KCl_(sat) colocado num compartimento de vidro, cuja extremidade inferior terminava na forma de capilar de Luggin-Haber com uma ponta de platina para o contato iônico e um eletrodo auxiliar - Pt em forma de espiral com área geométrica de 3,1 cm², soldada em vidro alcalino, esses eletrodos ficavam imersos na solução dos corantes em questão junto a um capilar de Luigin também acoplado a esse sistema.

Esse sistema foi conectado a um potenciostato do sistema PARC 283 da EG & G e um microcomputador IBM-286e e um espectrofotômetro de arranjos de diodos HP 8453 interligado a um microcomputador HP Kayak. Os potenciais de oxidação e redução foram escolhidos de acordo com medidas voltamétricas (dados não mostrados) esses potenciais foram fixados para todas as medidas espectrofotométricas realizadas sendo +1,5V para oxidação e -1,5V para redução.

Soluções estoque dos corantes a 1×10^{-3} mol/L foram preparadas em dimetilformamida (DMF) contendo tetrafluorborato de tetrabutilânionio como eletrólito de suporte 0,01 M e dimetilsulfóxido (DMSO), para a redução foi removido oxigênio durante 10 minutos com nitrogênio.

Para todas as medidas realizadas, foram explorados intervalos de potenciais de oxidação ou redução eletroquímica por 10 minutos do corante Sudan III á $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L e do Disperso Amarelo á 3×10^{-5} mol/L, os espectros foram monitorados simultaneamente à oxidação ou redução do corante sob potenciais fixos e as mudanças dos espectros monitoradas simultaneamente no intervalo de 250 a 800 nm no espectrofotômetro, a eletrólise foi finalizada para todas as medidas quando não eram mais observadas mudanças espectrais.

O corante Sudan III foi oxidado em DMF/TBF até o tempo de 2 horas e 40 minutos, enquanto a redução eletroquímica foi realizada em 1 hora e 40 minutos. A oxidação e a redução do Disperso Amarelo 9 em DMF/TBF foi medida de 10 em 10 minutos até o tempo de 1 hora e 40 minutos e 1 hora e 50 minutos respectivamente.

Foi realizada a mesma reação de oxidação do Sudan III em DMSO/TBF, por 40 minutos enquanto para o Disperso Amarelo 9 a oxidação durou 1 hora e 50 minutos. A redução em DMSO/TBF durou 2 horas e 20 minutos para o Disperso Amarelo 9 e 1 hora e 40 minutos para o Sudan III.

Os processos de oxidação eletroquímicos foram comparados com os ensaios dos corantes com S9. Para tanto, foram preparadas soluções estoque do corante Sudan III e Disperso Amarelo 9 á 1×10^{-3} mol/L, a partir dessa solução, foram empregadas diferentes alíquotas da mesma ao volume final de 2mL de um solvente compatível com a reação com S9, para que se obtivesse como concentração final $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L, $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L e $2,5 \times 10^{-5}$ mol/L para o Sudan III e 3×10^{-5} mol/L, 5×10^{-5} mol/L e 1×10^{-4} mol/L. Este solvente foi preparado conforme especificado para a solução de S9 (item 3.2.2), porém sem a adição da fração S9, por isso foi aqui denominado de S9- (S9 negativo).

Em seguida, foram empregados os seguintes volumes de S9: 50, 100, 200, 300 e 500 μL a fim de completar o volume final de 2mL em cada frasco, após realizada essa etapa, os frascos foram então incubados a 37°C por 1 hora e 30 minutos.

Ação do Sudan III e Disperso Amarelo sobre o DNA

Foi preparada uma solução do corante Sudan III á $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L e outra do Disperso Amarelo 9 á 3×10^{-5} mol/L em 2 ml de DMSO, e seguidamente foi realizada medida no espectrofotômetro. Nessas concentrações foram adicionadas 0,015, 0,03, 0,045, 0,075 e 0,15 mg/mL de DNA no corante Sudan III e 0,02, 0,04, 0,06, 0,1 e 0,2 mg/mL de DNA no corante Disperso Amarelo 9. A seguir adicionou-se 0,00088mg/mL de guanosina, partindo de uma solução estoque de 0,44mg/mL, no corante Sudan III á $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L e 0,0132, 0,039 e 0,079 mg/mL á 5×10^{-5} mg/mL nas soluções de 3×10^{-5} mol/L, 5×10^{-5} mol/L e 1×10^{-4} mol/L, de uma solução estoque á 1,32mg/mL sendo essas novas soluções medida no espectrofotômetro. O mesmo procedimento foi realizado utilizando DNA no entanto o solvente escolhido para os corantes foi o tampão fosfato pH= 7,4, e em seguida foram adicionadas as seguintes alíquotas crescentes de solução de DNA bovino: 0,015, 0,03, 0,045, 0,075 e 0,15 mg/mL em Sudan III á $2,5 \times 10^{-5}$ mol/L, $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L e $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L. Ao corante Amarelo Disperso 9 3×10^{-5} mol/L, 5×10^{-5} mol/L e 1×10^{-4} mol/L foram aliqüotados : 0,02, 0,04, 0,06, 0,1 e 0,2 mg/mL de DNA

Foram comparados os espectros a fim de determinar variações que pudessem ser decorrentes de possíveis interações entre os corantes analisados e a base nitrogenada específica guanosina e o DNA *in vitro*.

As soluções estoque de guanosina e DNA foram preparadas em água deionizada (Milli QPore).

3.2.2 Ensaio de mutagenicidade com Salmonella

Preparo das culturas de uso rotineiro

As linhagens de *Salmonella typhimurium* foram armazenadas permanentemente em freezer a -70°C, em ampolas com 0,9 mL de cultura e 0,1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotetor. As culturas de uso rotineiro também foram mantidas em freezer a -70 C° em ampolas com 180 μL de cultura e 20 μL de DMSO.

As culturas de uso rotineiro foram preparadas a cada 6 meses e as características genéticas de cada linhagem foram previamente avaliadas como descrito a seguir:

- 100 µL de cultura permanente foram inoculados em 20 mL de caldo nutriente com 25 µg/mL de antibiótico (ampicilina para as linhagens TA 98 e TA100 e canamicina para a linhagens YG1042) nenhum antibiótico foi empregado a TA1535 devido a ausência de plasmídeo que não apresenta resistência, após 16 horas de incubação sob agitação de 150 a 170 rpm, a cultura foi esfriada em placas de agar nutriente para isolamento das colônias.

Após incubação por 24 horas a 37°C, foram escolhidas ao acaso 5 colônias isoladas de cada linhagem, e estas, inoculadas em 5 mL de caldo nutriente, uma a uma.

Após incubação por 16 horas a 37°C, foram aliqüotados 180 µL da cultura e 20 µL de DMSO em ampolas para o uso rotineiro e 0,9 mL da cultura e 0,1 mL de DMSO para cultura permanente. As mesmas foram estocadas em freezer a -70°C. Cada cultura crescida nos 5 mL de caldo nutriente foi também inoculada utilizando zaragatoas esterilizados, em placas de agar mínimo com biotina, agar mínimo com biotina e histidina e agar nutriente para avaliação das características genéticas. As características genéticas avaliadas estão descritas a seguir.

Avaliação das características genéticas das linhagens

Conforme mostrado na Tabela 2, as linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas neste estudo possuem características genéticas específicas. Para que os resultados dos testes sejam confiáveis, é necessário que estas características sejam confirmadas. Para tanto, foram realizados os testes descritos abaixo, conforme recomendado por VARGAS e UMBUZEIRO (2003).

- Dependência de histidina

Inoculou-se a cultura crescida em caldo nutriente em placa de agar mínimo com biotina e, a seguir, em placa de agar mínimo com histidina e biotina. A dependência de histidina é confirmada pelo crescimento das linhagens em placa de agar mínimo com histidina e biotina e ausência de crescimento na placa com Agar mínimo com biotina.

- Mutação rfa

Colocou-se discos de papel de filtro de 5 mm de diâmetro embebidos em 10 µL de solução cristal violeta 1% no centro da placa de agar nutriente inoculada. Após incubação por 24 horas a 37°C, as linhagens contendo esta mutação apresentavam um halo de inibição de no mínimo 14 mm ao redor do disco.

- Plasmídeo pKM101

Com auxílio de uma alça de inoculação foram aplicadas cinco linhas de solução de ampicilina 8 mg/mL (uma linha para cada colônia a ser testada) em placa de agar nutriente. A seguir as culturas crescidas nos 5 mL de caldo nutriente foram inoculadas sobre as linhas do antibiótico. Após incubação de 24 horas a 37°C, as linhagens contendo esta mutação não apresentavam crescimento sobre a linha de antibiótico.

- Plasmídeo pYG233

O procedimento é o mesmo descrito para o plasmídeo pKM101, porém com utilização de 8 mg/mL de sulfato de canamicina como antibiótico.

- Deleção *uvrB*

Foram feitas cinco estrias (uma de cada colônia) numa placa de Agar nutriente. A seguir metade da placa foi coberta com gaze e irradiada com lâmpada germicida (ultravioleta 245 nm) de 15 watts a uma distância de 33 cm por 15 segundos. Após incubação por 24 horas a 37°C as linhagens que apresentavam esta mutação cresciam apenas no lado não irradiado (coberto) da placa.

Taxa de reversão espontânea

A taxa de reversão espontânea foi avaliada inoculando-se 100 µL de cada cultura em 2,0 mL de agar de superfície mantido em banho seco a 47°C, e vertendo-se a mistura, após homogeneização, sobre uma placa de agar mínimo. Cada cultura foi inoculada em triplicata. A taxa de reversão espontânea foi avaliada após 66 horas de incubação a 37°C e deveria estar dentro da faixa esperada para cada linhagem (Tabela 3).

TABELA 3. Taxa de reversão espontânea em revertentes por placa esperada para cada linhagem de *Salmonella typhimurium* usada neste trabalho:

Linhagem	Taxa de reversão esperada	Referências
TA98	25 –75	(UMBUZEIRO; VARGAS, 2003)
TA100	75 –225	(UMBUZEIRO; VARGAS, 2003)
TA1535	5-20	(MORTEMANS;ZEIGER, 2000)
YG1042	60-150	(RECH, 2007)*

* Comunicação pessoal

É importante salientar que a taxa de reversão espontânea pode variar de laboratório para laboratório (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Das 5 colônias analisadas de cada linhagem foram escolhidas 2 com características genéticas adequadas, e delas, foram preparadas culturas permanentes. As culturas de uso rotineiro correspondentes foram usadas como inóculo durante os ensaios pelo período de 6 meses.

Procedimento de ensaio

A avaliação da atividade mutagênica dos corantes foi feita utilizando o protocolo de pré-incubação. 100 µL das culturas provenientes de ampolas de uso rotineiro foram inoculadas em 20 mL de caldo nutriente e crescidas por 16 horas a 37°C sob agitação (informação fornecida por RECH, 2007). Após crescimento as culturas foram mantidas sob refrigeração até o momento do teste. Em tubos previamente esterilizados foram colocados 100 µL de cultura de cada linhagem (10^9 células/mL), 100 µL da solução dos corantes em diferentes concentrações e 500 µL de tampão fosfato 0,2 M para o ensaio na ausência de ativação metabólica ou o mesmo volume da mistura S9 para o ensaio na presença de ativação metabólica. Os tubos foram homogeneizados e incubados a 37°C por 30 minutos.

Após esse tempo foram adicionados 2,0 mL de agar de superfície, a mistura foi então homogeneizada e vertida em placa de Petri com 20 mL de agar mínimo. As placas foram incubadas invertidas, por 66 horas em temperatura de 37°C ($\pm 0,5$). O teste foi feito em triplicata. DMSO foi empregado como controle negativo e os controles positivos nos testes sem S9 foram: 4-nitroquinolina-1-óxido a 0,5 µg/placa para TA98 e TA100, 4-nitro-o-fenilene-diamina a 10,0 µg/placa para a linhagem YG1041 e 2-nitrofluoreno para a linhagem YG1042 a 10,0 µg/placa. Para os testes realizados na presença de S9, os controles positivos foram: 2-aminoantraceno a 2,5 µg/placa para TA98, TA100 e YG1042 e para a linhagem YG1041 foi usado este mesmo composto, porém na concentração de 0,0625 µg/placa (Tabela 3). A Figura 3 ilustra o esquema deste protocolo.

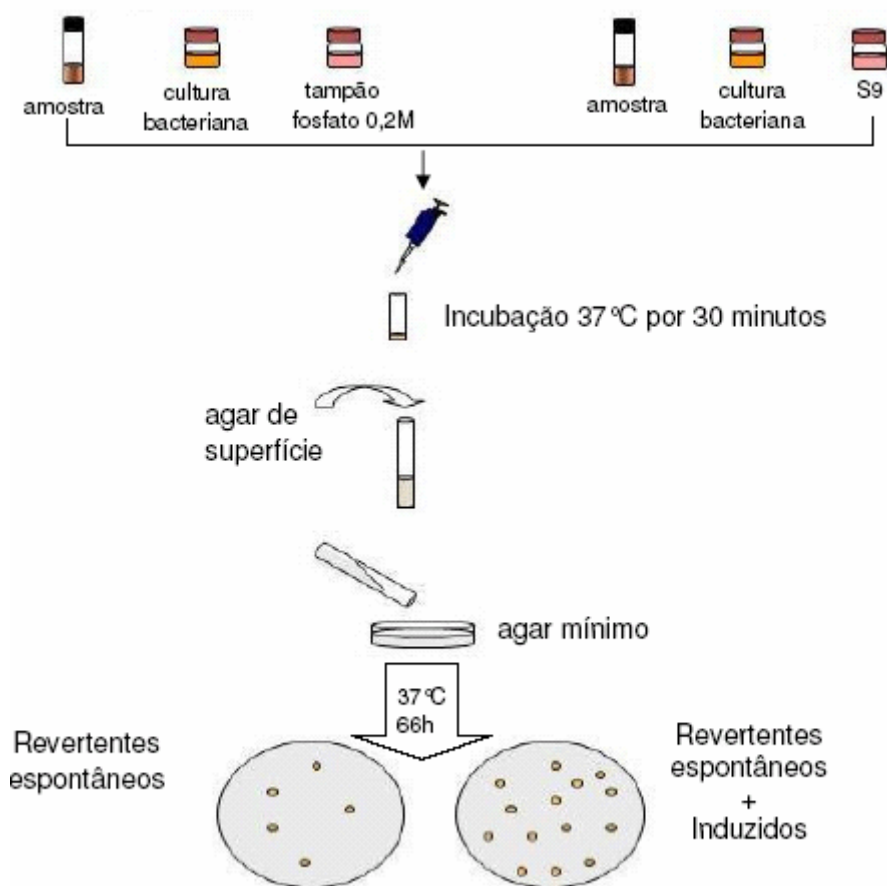


Figura 3. Esquema do teste *Salmonella*/microsossoma – método de pré-incubação. O número de revertentes por placa foi então avaliado utilizando-se um contador de colônias Phoenix CP600 Plus. Os testes foram feitos acompanhados da avaliação da viabilidade e da taxa de reversão espontânea das linhagens.

Avaliação da viabilidade

Foram transferidos 100 μ L da cultura crescida em caldo para um frasco contendo 90 mL de água de diluição (diluição -3). Esta mistura foi homogeneizada 30 vezes em ângulo de 45°. A seguir 100 μ L desta solução foram adicionados em outro frasco com 90 mL de água de diluição (diluição -6) e o mesmo procedimento foi tomado. 100 μ L desse último frasco foram adicionados em uma placa de Agar nutriente e espalhados através de uma Alça de Drigalski, fazendo para isso, movimentos circulares (diluição -7). Este ensaio foi feito em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e a viabilidade deveria estar na faixa de 1,0 – 2,0 $\times 10^9$ células/mL. Para a avaliação da taxa de reversão espontânea foi empregado o procedimento já descrito.

3.2.3 Avaliação da citotoxicidade de condrócitos:

Para avaliação da citotoxicidade de condrócitos dos corantes Sudan III e Disperso Amarelo 9 foram utilizadas duas metodologias: Exclusão por azul de tripano e produção de ácido láctico. Essa etapa do trabalho foi desenvolvida no laboratório da profa. Dra. Jill Urban, do laboratório de Fisiologia no Departamento de Anatomia, Genética e Fisiologia na University of Oxford (Inglaterra). Os experimentos foram realizados durante um estágio de curta duração realizada em janeiro de 2009 (Anexo 1).

Dessecação da pata da vaca em meio não estéril

A pata foi colocada sobre uma pia onde foi iniciada a limpeza com um escovão. Após limpeza, com um bisturi de calibre de 20 ou 22 (não estéril) foi retirada a pele da vaca pela parte traseira da pata, a fim de proteger a junta que se encontra na frente da pata. Quando a pele era tirada por completo, iniciou-se o corte próximo ao casco da pata, cortando-se os ligamentos que se encontram na parte de trás para facilitar que o casco se desprenda da pata. Após a limpeza, a pata foi colocada em balde contendo 10 % de hipoclorito de sódio por cerca de 30 minutos. Este procedimento foi estabelecido como norma de segurança que garante a remoção de possíveis microrganismos patogênicos.

Após a retirada da pata da vaca da solução de hipoclorito de sódio, esta foi lavada com água destilada, borrifada com álcool 70% sobre toda a pata para introduzi-la na capela. Foi colocado papel com álcool 70% ao redor da parte de baixo da pata da vaca para evitar que a mesma escorregue das mãos durante o processo de manipulação. Por segurança durante a dessecação da pata bovina, é importante a utilização de uma luva de aço, esterilizada com álcool 70 % por 30 minutos. Foram utilizados bisturis estéreis de calibre 20 ou 22, colocados em álcool 70% por 30 minutos em um tubo falcon de 50 mL (estéril) em uma capela. Basicamente foi seguido o mesmo procedimento de corte realizado anteriormente, ou seja, cortando os ligamentos da parte de trás da pata, pois desta forma irá ser mais fácil abrir a junta da mesma. Como a cartilagem está aderida ao osso (Figura 4), foi raspada a falange metacarpal delicadamente com o bisturi, após retirada da cartilagem essa foi imediatamente imersa em tubo falcon contendo meio DMEM completo enriquecido com colagenase tipo I á (0.37g/L).



Figura 4. Falange metacarpal bovina. Esta figura ilustra a cartilagem aderida ao osso.

Isolamento dos condrócitos

O tubo Falcon contendo a cartilagem e o meio de cultura completo com collagenase foi incubado a 37° Celsius por cerca de 20-24 horas em um *shaker* para que os condrócitos possam com a ajuda da collagenase se desgrudarem da matriz cartilaginosa. Após incubação, a solução obtida foi filtrada por filtro estéril de alumínio (120µm) a fim de remover a matriz extracelular. Foi adicionado meio DMEM completo até aproximadamente encher o tubo Falcon 50 mL contendo as células.

Em seguida o tubo foi centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos para a retirada da collagenase da solução. O pellet foi lavado com DMEM e novamente centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos. As células foram ressuspensas com DMEM para serem utilizadas nos ensaios. Para cada ensaio foi padronizada a utilização de um milhão de células por 0,25 ml eppendorf.

Ensaio de exclusão de azul de tripano com os condrócitos isolados

Foi mantida a proporção de 1:2 corante/células. O hematocítmetro ou Câmara de Neubauer foi abastecido com a solução e foram contadas as células viáveis (transparentes) e inviáveis (azuis), então foi utilizada a equação abaixo para calcular a quantidade de células existentes em milhões inicialmente

Total de células = $\frac{\text{Média células (2 quadrantes)} \times \text{Fator de diluição} \times 10^4 \times \text{Volume da suspensão}}{10^6}$

10⁶

O ensaio foi realizado com diferentes concentrações dos corantes Sudan III e , utilizando tempos de exposição de 1, 2, 3 e 24 horas.

Após expostos pelo tempo desejado, foi realizada nova contagem para comparar com o valor inicial.

Ensaio de ácido láctico

A concentração de lactato nas amostras analisadas foi avaliada empregando-se kit (Trinity-Biotech, No.735). Um reagente contendo lactato oxidase foi adicionado as amostras na proporção de 1:10. As soluções de Sudan III nas concentrações 1; 0,1; 1; 10; 100 e 1000 mg/ependorf enquanto que para o utilizou-se as seguintes concentrações 5; 0,5; 5; 50; 500 e 5000 mg/ependorf. Estas concentrações foram adicionadas à suspensão de células e incubadas pelo tempo de 1, 2, 3 e 24 horas. Após incubação, 10µL das amostras foram homogenizadas em um agitador de eppendorfs e pipetadas em 96 poços da placa de ELISA que reagiram com 100µL do reagente do kit. O DMSO atuou como o controle negativo.

A reação enzimática baseou-se na conversão do ácido láctico ao piruvato e ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O H₂O₂ induziu os cromóforos a produzirem coloração com absorbância máxima de 540 nm. A absorbância de cada poço foi lida após o tempo de 10 minutos de reação enzimática utilizando-se um espectrofotômetro para placas de ELISA. A concentração do lactato nas amostras foi baseada na curva padrão do ácido láctico (0 - 4 mmol/L).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Reação do corante Sudan III com a fração microssomal S9

Os corantes dispersos apresentam como característica a baixa solubilidade em água e são usualmente aplicados na forma de suspensões, e para aumentar a solubilidade destes compostos geralmente são aplicados aos banhos de tingimento os denominados agentes dispersantes que aumentam a ligação dos corantes às fibras têxteis.

Em nossos estudos, o corante Sudan III foi solubilizado em DMSO mostrando-se totalmente solúvel nas concentrações estudadas e a Figura 5 mostra o perfil espectrofotométrico do corante dissolvido em DMSO em diferentes concentrações.

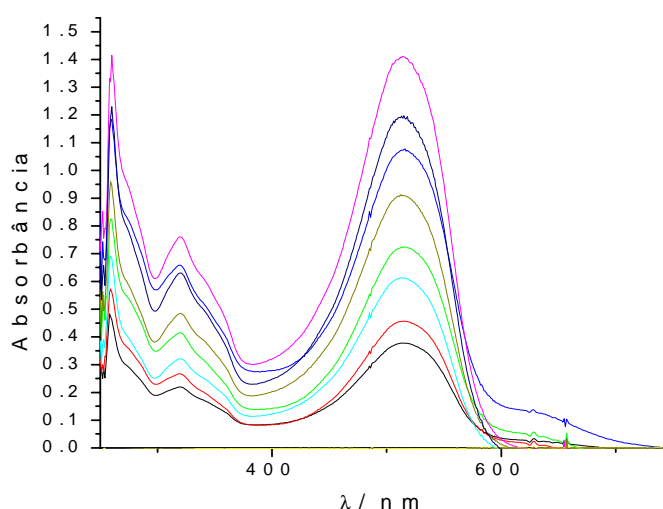


Figura 5. Espectro do corante Sudan III solubilizado em DMSO nas seguintes concentrações em ordem crescente: $2,5 \times 10^{-5}$; $3,5 \times 10^{-5}$; $4,5 \times 10^{-5}$; $5,5 \times 10^{-5}$; $6,5 \times 10^{-5}$; $7,5 \times 10^{-5}$; $8,5 \times 10^{-5}$ e 1×10^{-4} mol/L.

O espectro acima demonstra o comportamento do azo corante Sudan III solubilizado em DMSO, a figura mostra que o grupo cromóforo (azo) aparece no comprimento de onda 515 nm. Observa-se também que o corante apresenta como característica outras duas bandas uma em 258 nm e outra em 320 nm. No entanto, para as análises que devem ser realizadas, a banda que mais interessa é a próxima de 515 nm a qual é caracterizada pela banda responsável pela cor do corante azo, ou seja, do cromóforo.

A seguir, foi realizada a reação química do Sudan III em DMSO com S9, a fim de mimetizar as condições de oxidação hepática, no entanto, na presença de DMSO, a reação não ocorreu (dados não mostrados). Por este motivo, decidimos realizar a reação em meio aquoso, e para tanto o solvente escolhido foi o denominado de S9-, que contém os mesmos reagentes do S9, porém sem o cofator NADPH e o S9 propriamente dito, conforme já citado no item Material e Métodos. A Figura 6 ilustra as medidas espectrofotométricas do corante Sudan III solubilizado nesta nova condição.

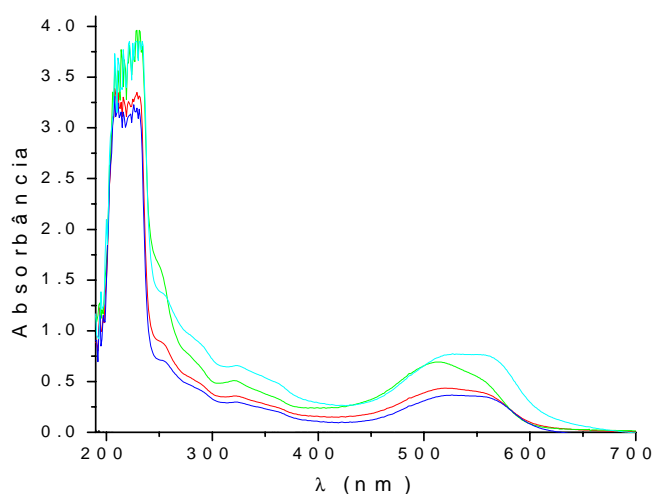


Figura 6. Espectro do corante Sudan III em meio aquoso (S9-, preparado seguindo o protocolo descrito em Material e Métodos) nas seguintes concentrações: $4,5 \times 10^{-5}$ mol/L; $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L; $6,5 \times 10^{-5}$ mol/L e $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L.

Ao alterar o solvente foram observadas variações espectrais, como pode ser observado para a banda do cromóforo que apresentou um leve, sendo agora visualizado em 530 nm, nas concentrações $4,5 \times 10^{-5}$ mol/L e $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L. Para as concentrações $6,5 \times 10^{-5}$ mol/L e $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L os picos apresentam-se um tanto distorcidos e variaram no seu comprimento de onda sendo aproximadamente 526 nm e 540 nm, respectivamente. Nota-se que ao redor de 220 nm não existe um pico definido para estas concentrações, no entanto, próximo de 250 nm aparece uma banda.

A seguir, investigou-se o comportamento de diferentes volumes da solução completa de S9, preparada seguindo o protocolo já descrito em Material e Métodos, porém na ausência do corante Sudan III, e após 1 hora e 30 minutos de incubação a 37 °C. Segundo a Figura 7, o S9 absorve ao redor de 340 nm e, antes desse comprimento de onda, ocorre absorvância negativa que pode ser consequência do material particulado presente no S9.

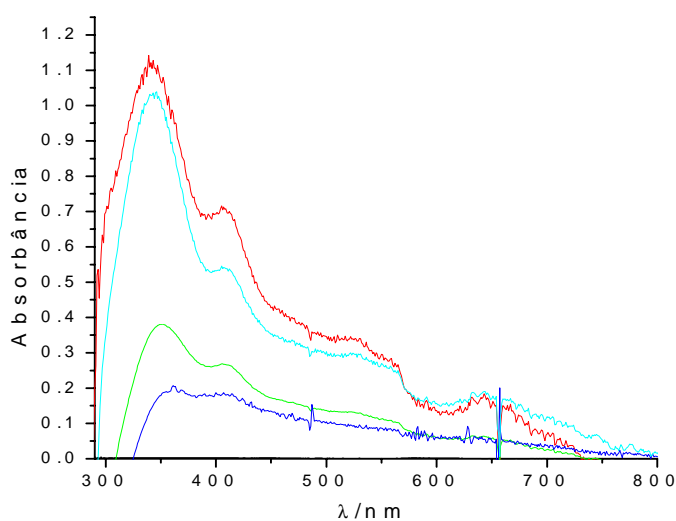


Figura 7. Espectros da solução de S9, preparado seguindo o protocolo descrito em Material e Métodos, em diferentes volumes após incubação de 1 hora e 30 minutos a 37°C na ausência do corante. Os traçados representam: (Azul escuro) 50μL, (verde) 100 μL, (azul claro) 200μL e (vermelho) 300 μL S9.

Após traçar o perfil espectrofotométrico da solução de S9, foi realizado o estudo da ação desta fração sobre o corante Sudan III. Para tanto foram testados diferentes concentrações do corante : $2,5 \times 10^{-5}$ mol/L; $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L; $6,5 \times 10^{-5}$ mol/L e $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L; incubados com volumes diferentes de S9: 50μL, 100μL, 200μL, 300μL e 500μL por 1 hora e 30 minutos a 37 °C.

Como esperado, após a reação foi observada absorvância negativa no início do espectro, atribuída ao material particulado presente no S9. Assim, a solução foi filtrada e posteriormente analisada nas mesmas condições espectrofotométricas a fim de avaliar a formação de produtos solúveis. As Figuras 8, 9 e 10 (a) representam as diferentes concentrações dos corantes, e o perfil de formação de seus respectivos produtos solúveis podem ser vistos nas Figuras 8, 9 e 10 (b).

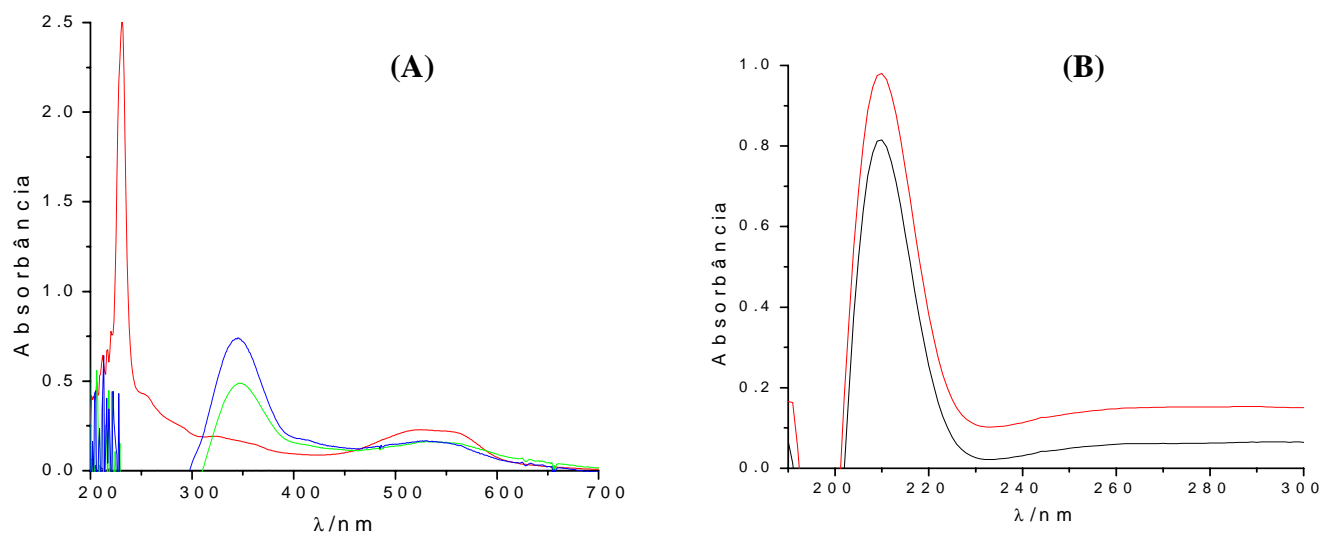


Figura 8. (A) Espectro do corante Sudan III à $2,5 \times 10^{-5}$ mol/L antes (vermelho) e após a adição de 50 μL (verde) e 100 μL (azul) de solução de S9 e incubação por 1 hora e 30 minutos a 37° C. (B) Perfil da solução após a filtração, com 50 μL (vermelho) e 100 μL (preto) de solução de S9.

Observando-se a Figura 8 (A), nota-se que a adição de 50 μL e 100 μL da fração S9 provoca a redução da banda do grupo azo. Essa redução é proporcional à adição do S9, sugerindo que tal diminuição seja caracterizada pela quebra da ligação azo com conseqüente formação de Hidrazo, que é uma molécula intermediária à quebra do grupo azo na formação de amina. A adição de 200, 300 e 500 μL de S9 acarretou distorção dos resultados, com forte precipitação o que prejudicou as análises, devido à grande quantidade de S9 empregada na solução (dados não mostrados).

A Figura 8 (B) mostra que após a filtração a adição de 50 e 100 μL de S9 ao Sudan III à $2,5 \times 10^{-5}$ mol/L, resultaram em dois picos distintos em 210 nm que antes da filtração não eram percebidos. A intensidade de formação destes picos é proporcional à adição de S9, logo se supõe que o S9 tenha agido na molécula do corante metabolizando-o tendo gerado metabólitos solúveis. É evidente que em 540 nm não aparece o grupo cromóforo uma vez que ele ficou retido no filtro após a filtração do composto químico.

A Figura 9 (A e B) mostra os resultados do mesmo estudo utilizando a concentração de $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L do corante Sudan III.

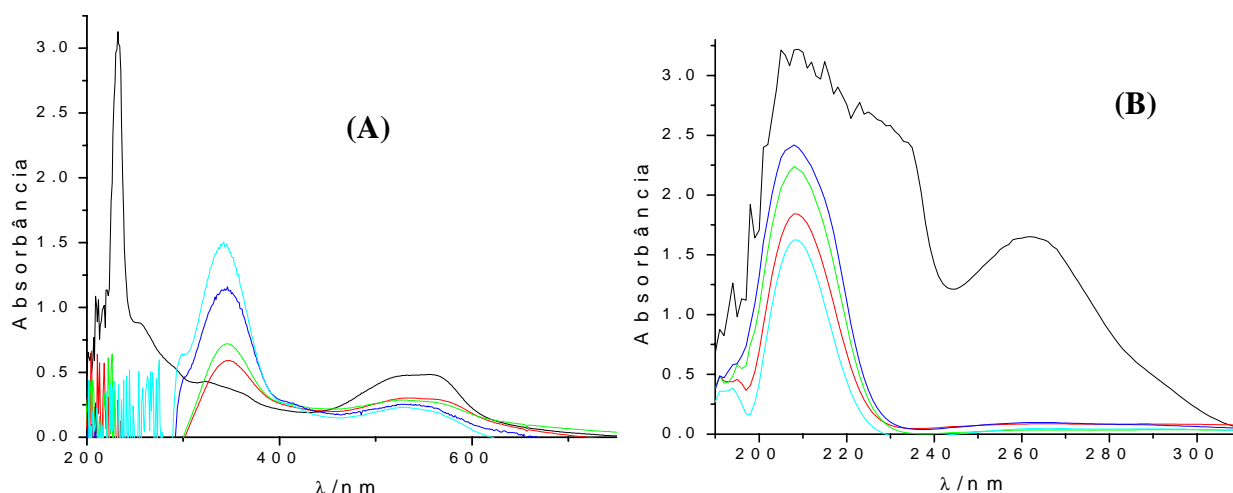


Figura 9. (A) Espectro do corante Sudan III á $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L antes (preto) e após a adição de 50µL (vermelho), 100 µL (verde), 200µL (azul escuro) e 300 µL (azul claro) da solução de S9, e incubação por 1 hora e 30 minutos a 37° C. *(B) Perfil da solução após a filtração, 50µL (azul claro), 100 µL (vermelho), 200µL (verde) e 300 µL (azul escuro) e 500µL (preto) de solução de S9.

Analisando a Figura 9 (A), observa-se que com a adição de 50, 100, 200 e 300 µL da fração S9, a absorvância do pico referente ao grupo azo do Sudan III a $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L cai de 0,47 para 0,30; 0,28; 0,24 e 0,22, respectivamente, indicando a metabolização do grupamento. Observa-se ainda que no comprimento de onda 340 nm aparece um pico que aumenta à medida que o volume de S9 aumenta, isso ocorre pois supostamente esta é a banda que absorve o S9.

Devido à absorvância negativa decorrente da precipitação do S9, as soluções foram também filtradas. A Figura 9 (B) mostra que após este procedimento podem ser observadas quatro bandas ao redor de 208 nm, nota-se que estas bandas aumentam à medida que maiores concentrações de S9 são adicionadas, e são provavelmente referentes a um novo produto gerado após metabolização do corante. Quando foram adicionados 500 µL de S9 a banda não aparece mais em 208 nm e sim em 260nm, sendo originada provavelmente por excesso de S9 que impede que se observe o produto formado. Esses resultados sugerem que um novo produto que absorve ao redor de 208 nm é formado até determinada proporção e pode ser visualizado apenas após filtração do produto de incubação.

A Figura 10 demonstra o comportamento do corante Sudan III a $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L com os seguintes volumes da fração S9: 50, 100, 200, 300 e 500 µL.

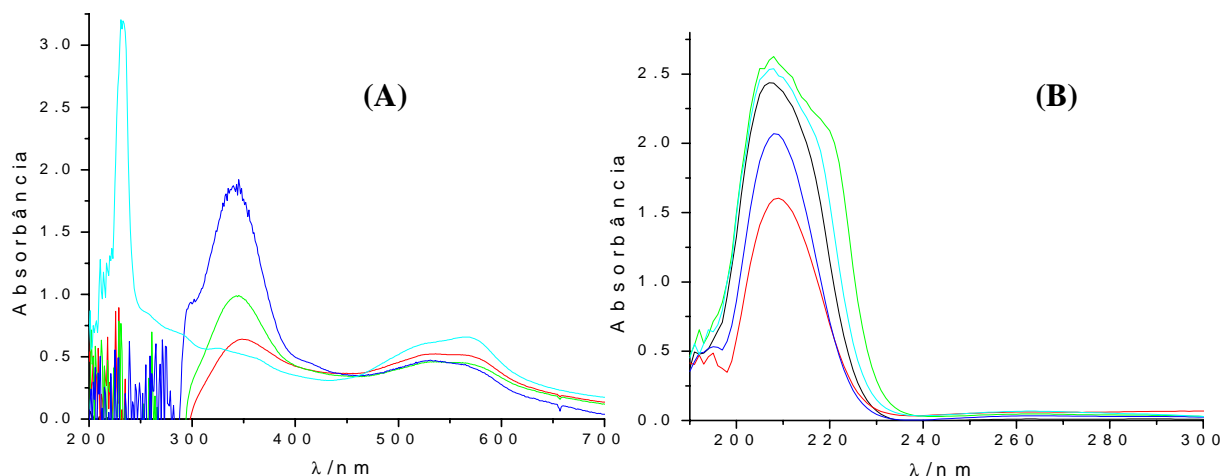


Figura 10. (A) Espectro do corante Sudan III á $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L (azul claro) e após a adição de: 50µL (vermelho), 100 µL (verde), 200µL (azul escuro) da solução de S9, e incubação por 1 hora e 30 minutos a 37° C. (B) Perfil da solução após a filtração, 50µL (vermelho), 100 µL (azul escuro), 200µL (preto), 300 µL (azul claro) e 500 µL (verde) de solução de S9.

Após análise da Figura 10 (A) observa-se que a função azo apresenta diminuição do pico após adição de 50, 100 e 200µL, da mesma forma que foi observado para as outras concentrações. Quando foram adicionados os volumes de 300 e 500µL, ao invés de ocorrer diminuição da banda do azo, ocorreu a formação de ruídos em 339 sugerindo que houve saturação do S9, visto que a concentração do corantes estava muito alta.

Após a filtração (Figura 10 B), o mesmo comportamento foi observado, ou seja, a visualização de bandas provavelmente relativas à formação de compostos solúveis após a metabolização.

Todos os resultados foram repetidos e confirmados.

4.2 Reação do corante Disperso Amarelo 9 com a fração microssomal S9

Inicialmente o corante Disperso Amarelo 9 foi também solubilizado em DMSO e apresentou-se solúvel, da mesma forma que o Sudan III em todas as concentrações testadas, a Figura 11 mostra o comportamento espectrofotométrico do composto nas seguintes concentrações 1×10^{-5} (azul); 3×10^{-5} (verde); 5×10^{-5} (vermelho) e 1×10^{-4} mol/L (preto).

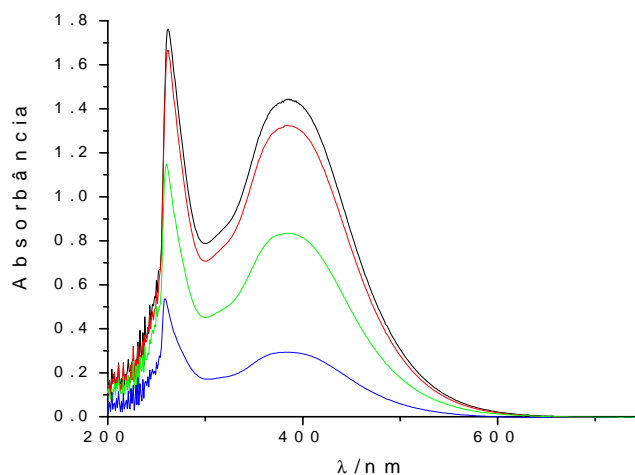


Figura 11. Espectro do corante Disperso Amarelo 9 solubilizado em DMSO nas seguintes concentrações em ordem crescente: 1×10^{-5} (azul); 3×10^{-5} (verde); 5×10^{-5} (vermelho) e 1×10^{-4} mol/L (preto).

De acordo com a Figura 11, nota-se que a banda do grupo cromóforo aparece ao redor de 400 nm, outra banda é observada ao redor de 270 nm.

Conforme já explicado anteriormente, na presença de DMSO, a reação com S9 não ocorre e por isso, foi necessária a verificação da solubilidade do corante Disperso amarelo 9 e mio aquoso, ou S9-.

A Figura 12 demonstra que o corante Disperso Amarelo 9 é solúvel no meio aquoso S9-. A banda responsável pelo grupo cromóforo (objeto de estudo) aparece em 380 nm, enquanto outros dois picos de baixa resolução aparecem ao redor de 230 nm e 262 nm.

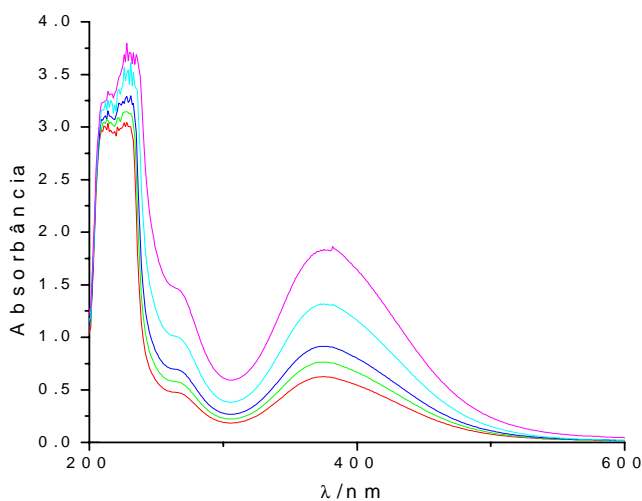


Figura 12: Figura mostra a solubilização do corante Disperso Amarelo 9 em S9- nas seguintes concentrações 3×10^{-5} , (vermelho), verde 4×10^{-5} , azul escuro 5×10^{-5} , azul claro 7×10^{-5} e rosa 1×10^{-5} mol/L.

Após a confirmação da solubilidade do corante em meio aquoso, foi realizada a reação do Disperso Amarelo 9 com volumes variados de S9, para analisar a possível ação das isoenzimas sobre o grupo cromóforo, mantendo a concentração de 3×10^{-5} mol L⁻¹ do corante.

Observa-se na Figura 13 (A) que a adição de 50 μ L de S9 provocou um leve deslocamento da banda do cromóforo para 374 nm, enquanto a adição de 100 μ L deslocou para 353 nm, sugerindo que ocorreu a ação das enzimas no grupamento cromóforo. Com as subseqüentes adições de volumes crescentes de S9, a banda se estabilizou em 353 nm, no entanto com a adição crescente de S9, ocorreu aumento da absorbância da banda responsável pelo grupo cromóforo chegando até 2.

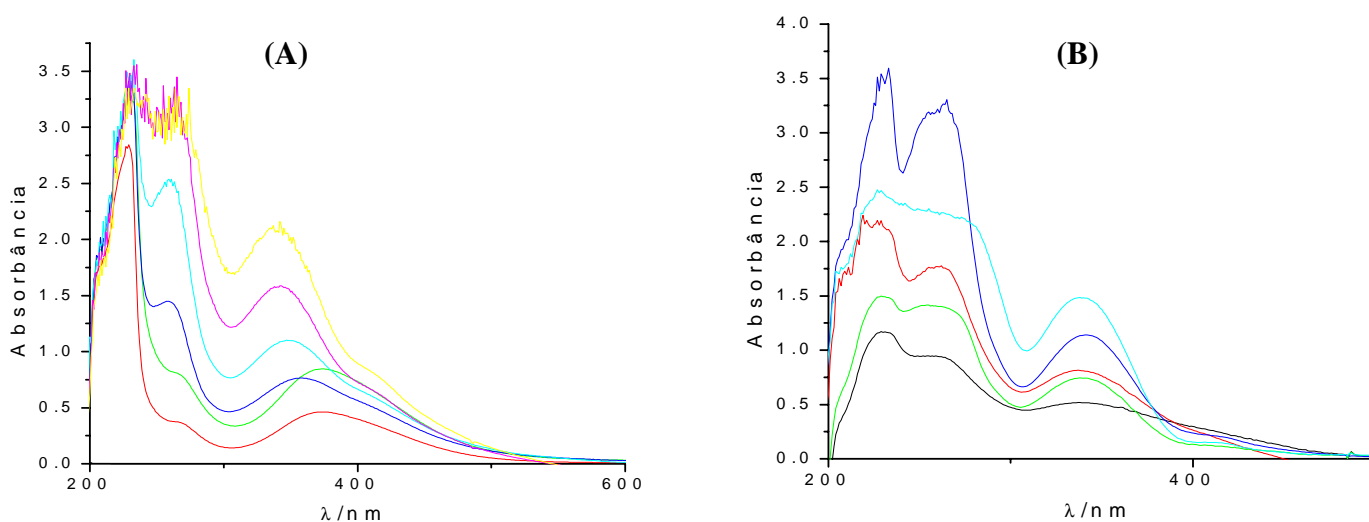


Figura 13. (A) Espectro do corante Disperso Amarelo 9 à 3×10^{-5} mol/L (vermelho) e após a adição de 50 μ L (verde), 100 μ L (azul escuro), 200 μ L (azul claro) e 300 μ L (rosa) e 500 μ L (amarelo) da solução de S9, e incubação por 1 hora e 30 minutos a 37° C. *(B) Perfil da solução após a filtração, 50 μ L (verde), 100 μ L (vermelho), 200 μ L (azul escuro) e 300 μ L (azul claro) de solução de S9.

Após observada a reação *in vitro* do Disperso Amarelo 9 à 3×10^{-5} mol L⁻¹, a solução foi filtrada na tentativa de evidenciar algum composto solúvel que possa ter ficado sobreposto à precipitação do S9.

Observa-se na Figura 13(B) que a adição de S9 nas condições estabelecidas após filtração, ocasionou a geração de um pico em 340 nm, que pode ser devido ao deslocamento da banda característica do grupamento cromóforo.

A fim de melhor traçar a reação de metabolização entre as enzimas do Citocromo P450 e o corante Disperso Amarelo 9, decidimos aumentar a concentração do corante para $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

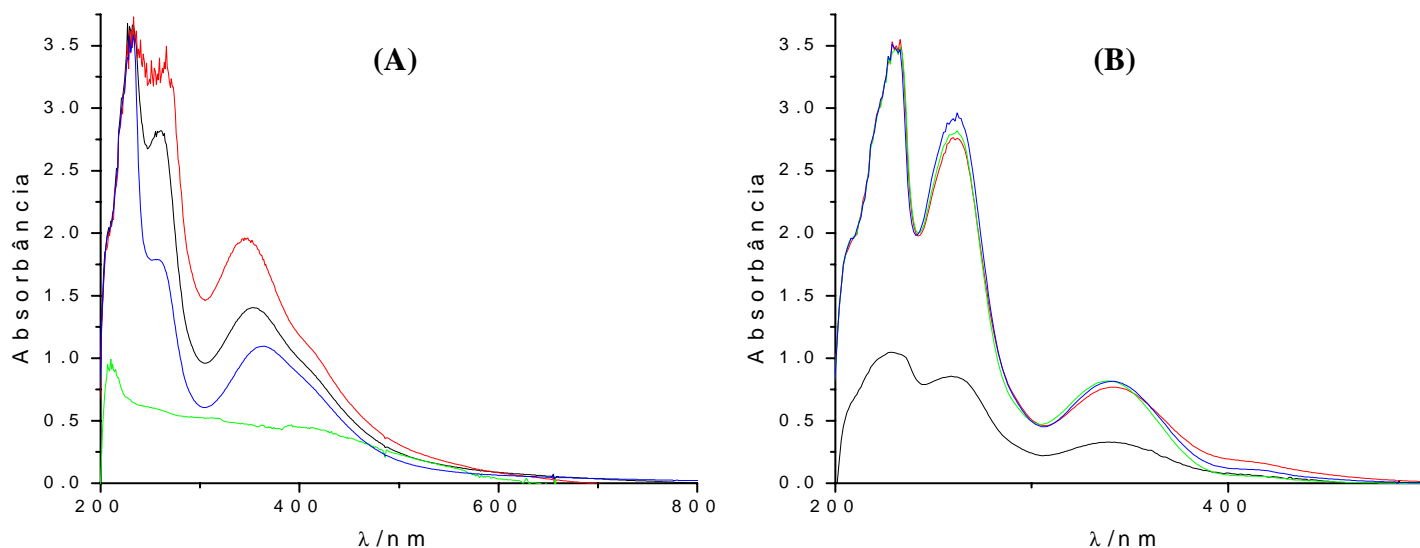


Figura 14. (A) Espectro do corante Disperso Amarelo 9 á $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (azul escuro) e após a adição de 50 μL (preto), 100 μL (vermelho), 200 μL (verde) da solução de S9, e incubação por 1 hora e 30 minutos a 37° C . *(B) Perfil da solução após a filtração, Disperso Amarelo 9 (preto) e 50 μL (vermelho), 100 μL (verde), 200 μL (azul escuro) de solução de S9.

Na concentração de $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, Figura 14 (A) aparentemente a quebra do grupo cromóforo (364 nm) ocorreu a partir da incubação com 200 μL de S9, no entanto é possível observar a formação de um novo composto que surge ao redor de 215 nm que possa ser produto da reação do S9. Ainda, na mesma Figura a adição de 50 e 100 μL de S9 parece causar um aumento na absorbância do cromóforo que vai de 1,09 para 1,40 após a reação com 50 μL de S9 e 1,96 após incubação de 100 μL de S9. Esses resultados sugerem que possa ter ocorrido alguma alteração na molécula do corante capaz de resultar em aumento de absorbância.

A Figura 14(B) demonstra que o grupo cromóforo ainda é evidente mesmo após a filtração em 340 nm a absorbância é de 0,32 nm enquanto as adições crescentes de S9 (50, 100 e 200 μL) acarretaram em aumento da absorbância da banda em 340 nm para 0,81.

A seguir aumentou-se a concentração do Disperso Amarelo 9 para $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, nota-se que após incubação com S9 ocorreu um aumento da banda do cromóforo em 380 nm, a

partir da adição de 100µL de S9, ocorreu deslocamento do comprimento de onda para a esquerda até a máxima adição de 500µL. Nota-se que as adições de 300, 400 e 500µL provocaram distorção do espectro provavelmente devido a presença de algum produto precipitado na solução provavelmente proveniente do S9. Sendo assim, filtrou-se a solução a fim de se obter produtos solúveis que pudessem ter sido formados a partir da incubação com o S9, (Figura15(B)).

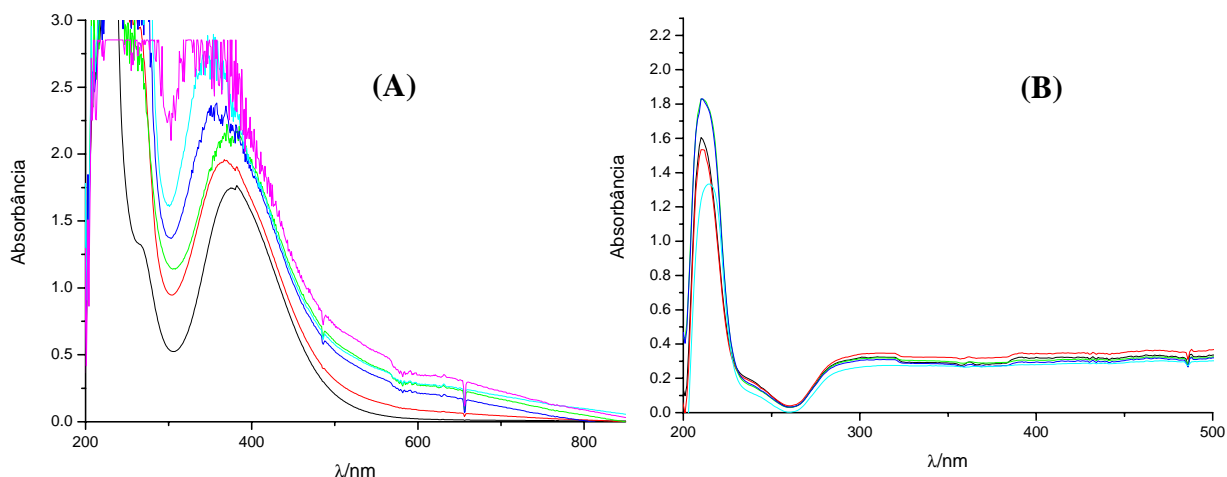


Figura 15. (A) Espectro do corante Disperso Amarelo 9 á 1×10^{-4} mol/L (preto) 50µL (vermelho), 100 µL (verde), 200µL (azul escuro), 300µL (azul claro) e 500µL (rosa) da solução de S9, e incubação por 1 hora e 30 minutos a 37° C. *(B) Perfil da solução após a filtração, 50µL de S9 (azul claro), 100 µL (vermelho), 200µL (preto) e 300µL (azul escuro) e 500µL (verde).

Na Figura 15(B) é possível observar a formação de compostos solúveis que absorvem ao redor de 210 nm, nota-se que estes compostos aumentam a absorbância de acordo com o aumento de S9 empregado ao corante Disperso Amarelo 9, sugere-se então que o S9 possa ter formado produtos solúveis que possam ser detectados apenas após filtração.

4.3 Oxidação e redução eletroquímica do corante Sudan III

Conforme já citado, os processos de biotransformação sejam eles de oxidação ou de redução dos corantes do tipo azo podem gerar diversos compostos como aminas aromáticas. Deste modo, foi desenvolvido um método eletroquímico visando simular a oxidação e a

redução do corante Sudan III *in vitro* em condições biológicas, a fim obter e conhecer produtos os eventuais produtos de metabolização.

Oxidação e redução espectroeletróquímica do corante Sudan III

Para este estudo, foi utilizado o solvente DMF e o eletrólito suporte TBF/TBA. Essa condição foi escolhida, pois apresenta melhor eficiência na oxidação e redução do Sudan III, em estudos preliminares. Adicionalmente, para este estudo foi utilizada a concentração de $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L baseando-se nos estudos de oxidação com S9 (item 4.1). O espectro de absorção na região do UV-Vis para o corante Sudan III nas condições do estudo caracteriza-se por uma banda bem definida de máxima absorbância em comprimento de onda (λ) de 510 nm (Fig 16), atribuída ao grupo azo que age como grupo cromóforo na molécula. Os experimentos de oxidação espectroeletróquímica do corante Sudan III em DMF foram realizados sob potencial de +1,5V, estabelecidos em estudos voltamétricos (dados não mostrados).

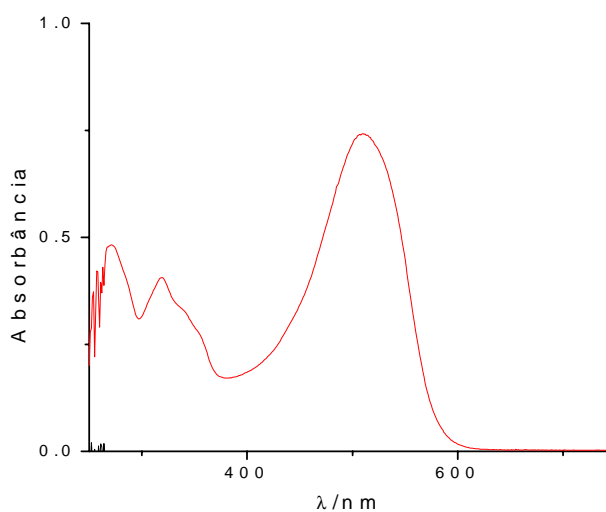


Figura 16. Espectro de absorção na região UV-Vis para solução $5,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ do corante Sudan III em DMF/THF 0,01 mol L⁻¹.

O estudo de oxidação eletroquímica foi conduzido por 2 horas e 40 minutos de eletrólise e a os resultados estão mostrados na Figura 17. Pode-se perceber claramente que durante esse tempo de oxidação, o grupamento azo (banda em 510 nm) foi modificado, tendo em vista a diminuição da absorbância em função do tempo de eletrólise. Suspeitou-se da quebra do cromóforo ainda durante o experimento, uma vez que se observou descoloração da solução do corante, inicialmente vermelha, durante o procedimento. Provavelmente aminas

aromáticas foram geradas durante a oxidação, como já observado por LIZIER, 2009, o que também deve ter ocorrido após a reação com S9.

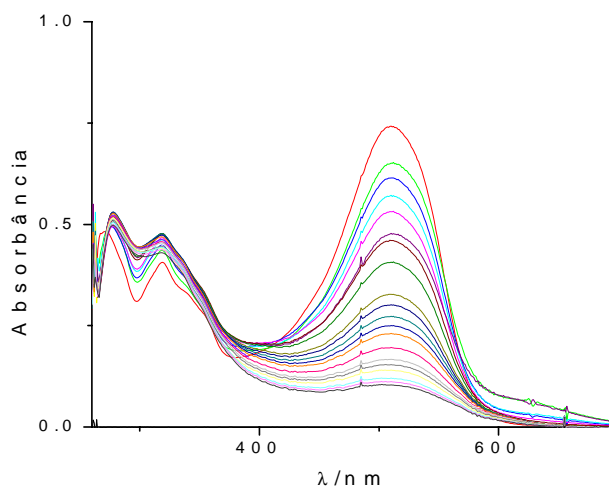


Figura 17. Espectro obtido durante a oxidação do corante Sudan III ($5,5 \times 10^{-5}$ mol/L) em DMF/THF (0,01 mol/L). Espectros registrados a cada 10 minutos de eletrólise até o tempo de 2 horas e 40 minutos sob potencial fixo de +1,5V, sendo o traçado vermelho o tempo zero de reação e os outros correspondentes à leitura a cada 10 minutos de reação.

A descoloração ou quebra do grupamento cromóforo do corante é tempo dependente e pode ser observado na Figura 18. A eletrólise do corante promove a supressão da banda do cromóforo em 87% após 2 horas e 20 minutos de eletrólise.

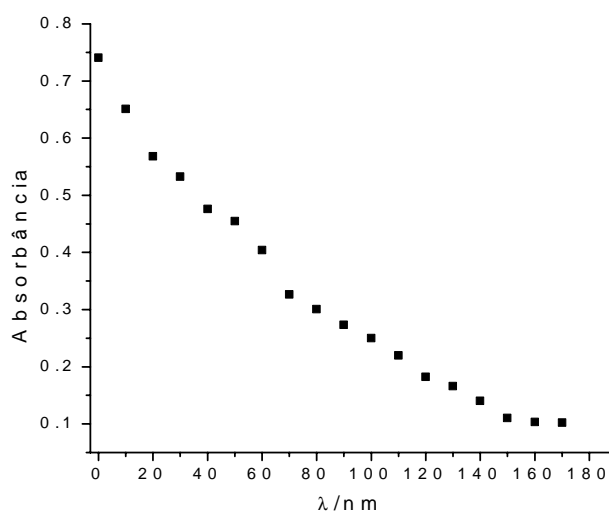


Figura 18 – Descoloração da solução de $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L do corante Sudan III em DMF / TFBTBA sob potencial fixo de + 1,5V ($\lambda = 510$ nm).

Pelo mesmo motivo mencionado nos estudos de oxidação, a reação de redução foi realizada em DMF. Ao observar a Figura 19, pode-se notar que após a aplicação do potencial e -1,5v ocorre decaimento do grupo azo em função do tempo redução da solução até o tempo de 1 hora e 40 minutos, no entanto o comportamento redutivo neste solvente não acarreta a formação de radical visível nas condições avaliadas.

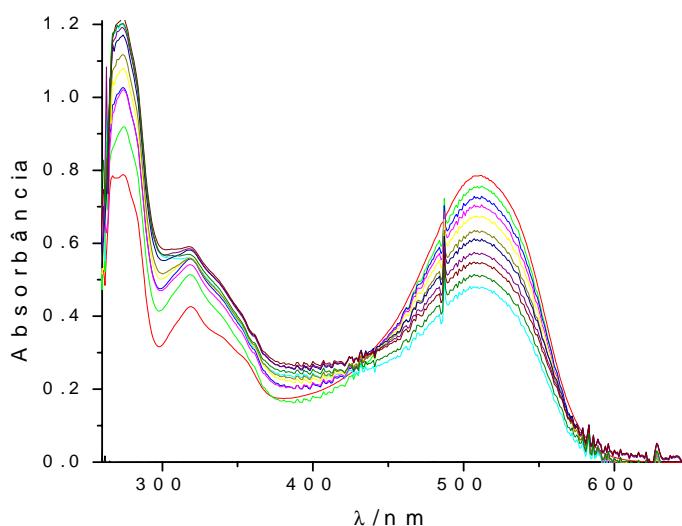


Figura 19. Espectro obtidos durante a redução do corante Sudan III ($5,5 \times 10^{-5}$ mol/L) em DMF/THF ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$). Espectros registrados a cada 10 minutos de eletrólise até o tempo de 1 hora e 40 minutos sob potencial fixo de $-1,5\text{V}$, sendo o traçado vermelho o tempo zero de reação e os outros correspondentes à leitura a cada 10 minutos de reação.

A Figura 20 demonstra o decaimento da banda do cromóforo, avaliada pela redução da absorbância, em função do tempo de redução eletroquímica. Nota-se que a supressão da banda do cromóforo foi de 40% após 1 hora e 40 minutos de redução.

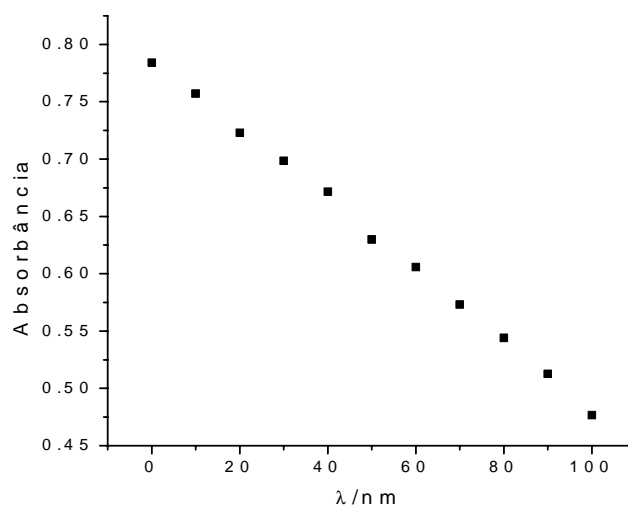


Figura 20. Descoloração da solução de $5,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do corante Sudan III em DMF/TFBTBA sob potencial fixo de $-1,5\text{V}$ ($\lambda = 510 \text{ nm}$).

Embora o solvente DMF tenha sido considerado ótimo para a oxidação e redução eletroquímica, o estudo foi repetido com DMSO, pois esse é o solvente de escolha para estudos em células e algumas bactérias. Assim, o produto da reação poderá ser utilizado para o ensaio de mutagenicidade com *Salmonella* nos estudos posteriores.

Assim, o estudo de oxidação eletroquímica foi repetido com o corante Sudan III em DMSO a $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L/ TFBTBA (0,1M), como mostrado na Figura 21. Nota-se que ocorreu diminuição da banda do cromóforo a 515 nm após 10 minutos de oxidação. A banda decresceu até o tempo de cerca de 40 minutos tornando-se estável. Paralelamente foi observado a formação de uma nova banda em 615 nm que aumentou gradativamente com o tempo da oxidação até atingir absorbância máxima de 0,56 no tempo de 40 minutos. Sugere-se que durante a oxidação do Sudan III nas condições estabelecidas, tenha sido formado um radical como consequência do processo de oxidação. O radical provavelmente foi formado devido a perda de um elétron, gerado pela oxidação, a perda do e^- , faz com que o mesmo se desloque pela molécula gerando então a formação de um radical, que absorve em 615 nm e provavelmente irá anteceder a quebra do grupo azo.

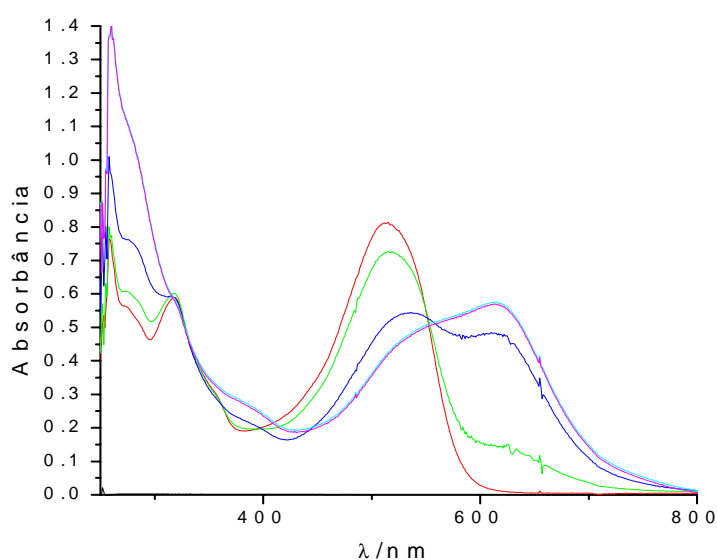


Figura 21. Espectros obtidos durante a oxidação simultânea do corante Sudan III á ($5,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) em DMSO/ TFBTBA (0,01 mol L⁻¹). Espectros registrados a cada 10 minutos de oxidação até o tempo de 40 minutos sob potencial fixo de +1,5V: vermelho (tempo 0), verde (10 minutos), azul escuro (20 minutos), azul claro (30 minutos) e lilás (40 minutos).

A Figura 22 mostra os espectros de UV-Vis obtidos durante a redução de $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L do corante Sudan III em DMSO/TFBTBA sob potencial de -1,5V.

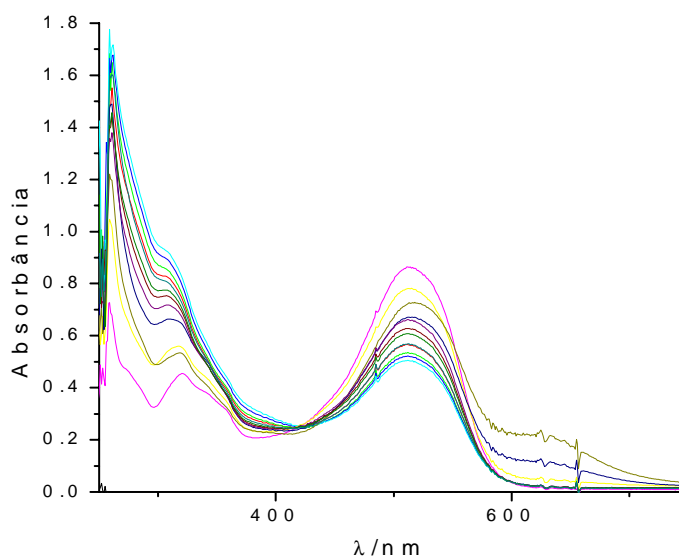


Figura 22. Espectro obtidos durante a redução simultânea do corante Sudan III à ($5,5 \times 10^{-5}$ mol/L) em DMF/THF (0,01 mol/L). Espectros registrados a cada 10 minutos de eletrólise até o tempo de 1 horas e 40 minutos sob potencial fixo de +1,5V, sendo o traçado rosa o tempo zero de reação e os outros correspondentes à leitura a cada 10 minutos de reação.

Nota-se que nos primeiros 10 minutos de eletrólise, ocorreu um decaimento da banda do cromóforo em cerca de 513 nm enquanto simultaneamente ocorreu a formação de uma banda tempo dependente no comprimento de onda de 631 nm até o tempo de 30 minutos como consequência da redução eletroquímica (Figura 22). A formação do pico em 631 nm sugere que houve a formação de um radical, bastante instável, pois, após o tempo de 40 minutos de eletrólise não houve mais a formação de pico ao redor deste comprimento de onda. Após o tempo de 40 minutos, no entanto ainda é possível observar o decaimento da banda do cromóforo até o tempo de 1 hora e 40 minutos.

A análise dos espectros obtidos durante redução do corante sob potencial de $-1,5V$ mostra uma queda na intensidade da banda do cromóforo, indicando que a redução do grupo azo é capaz de ocorrer, este fato pôde ser observado durante a reação pela descoloração gradativa da solução.

A Figura 23 representa a curva do decaimento da banda do grupo azo em 513 nm. Enquanto a Figura 24 demonstra a crescente formação do radical.

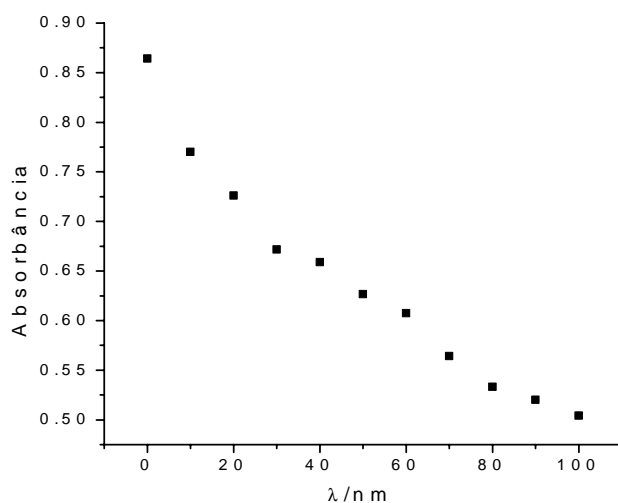


Figura 23 – Descoloração da solução de $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L do corante Sudan III em DMSO / TFBTBA sob potencial fixo de + 1,5V ($\lambda = 513$ nm).

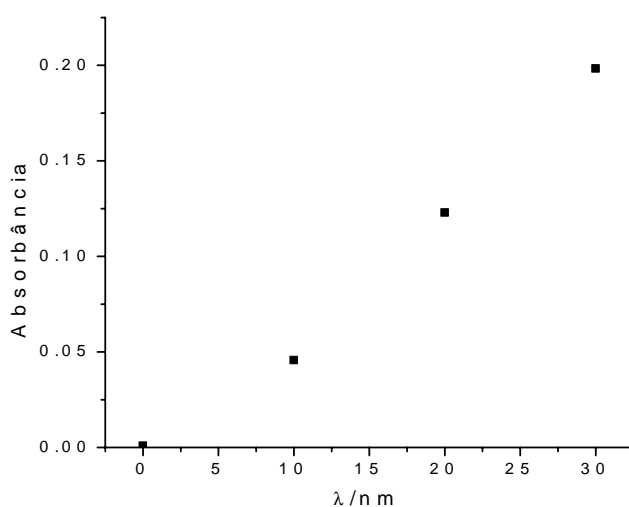


Figura 24 – Espectro do aumento da formação do radical gerado após redução do Sudan III á $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L do corante Sudan III em DMSO / TFBTBA sob potencial fixo de + 1,5V até o tempo de 40 minutos ($\lambda = 631$ nm).

Oxidação e redução espectroeletróquímica do corante Disperso Amarelo 9

A Figura 25 demonstra o comportamento do corante Disperso Amarelo 9 á 3×10^{-5} mol/L em DMF/THF $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, nota-se que o corante apresenta um pico responsável pelo grupo cromóforo ao redor de 400 nm e outra banda aparece em 266 nm.

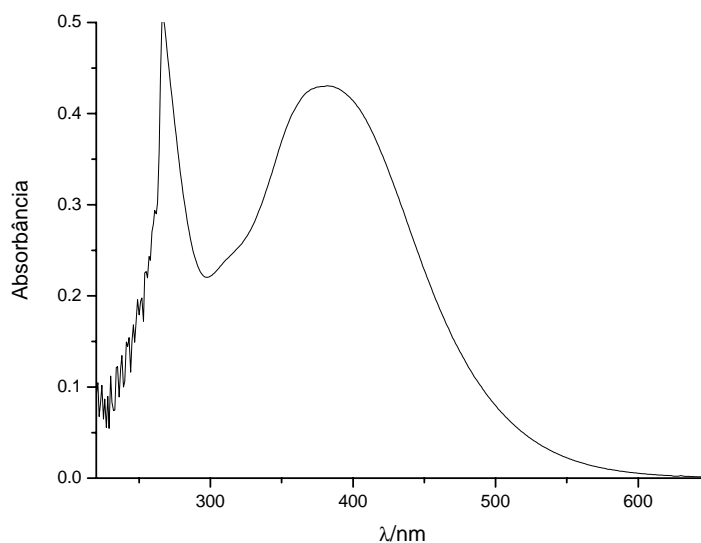


Figura 25. Espectro de absorção na região UV-Vis para solução $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do corante Disperso Amarelo 9 em DMF/THF $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

Os experimentos de oxidação espectroeletroquímica do corante Disperso Amarelo 9 em DMF foram realizados sob potencial de +1,5V, da mesma forma como realizado para o corante SudanIII.

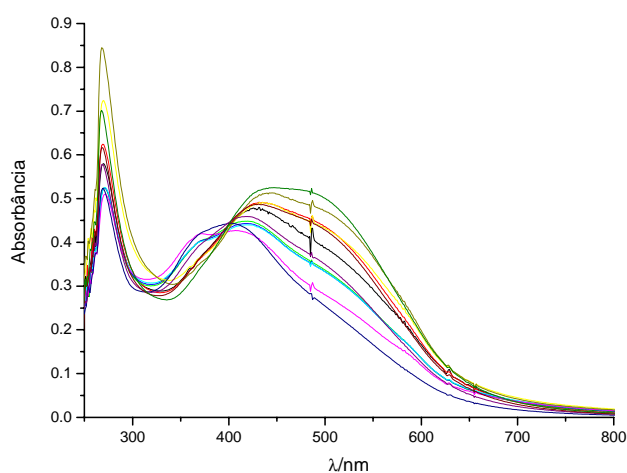


Figura 26. Espectro obtido durante a oxidação do corante Disperso Amarelo 9 ($3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) em DMF/THF ($0,01 \text{ mol/L}$). Espectros registrados a cada 10 minutos de eletrólise até o tempo de 1 hora e 40 minutos sob potencial fixo de +1,5V, sendo o traçado azul escuro o tempo zero de reação e os outros correspondentes à leitura a cada 10 minutos de reação.

A Figura 26 demonstra o comportamento da oxidação eletroquímica do Disperso Amarelo 9 em DMF/THF ($0,01 \text{ mol/L}$), a eletrólise durou 1 hora e 40 minutos, após esse

tempo não foram mais observadas mudanças espectrais. Pode-se perceber claramente que durante esse tempo de oxidação, o grupamento cromóforo (banda em 400 nm) praticamente não se alterou, no entanto outra banda foi se formando e se deslocando levemente, até os últimos 20 minutos de eletrólise, quando pode-se a formação de uma nova substância uma vez que o nova banda aparece em 460 nm com absorbância de 0,55.

Como não ocorreu diminuição da banda em 400nm sugere-se que provavelmente o grupamento cromóforo não tenha sofrido quebra durante a oxidação, no entanto o espectro demonstra que possa ter ocorrido alguma diferenciação da substância química inicial indicando que a oxidação é capaz de modificar a molécula do corante Amarelo 9.

Após verificar o comportamento oxidativo do corante Disperso Amarelo 9 em DMF, avaliou-se o comportamento redutivo da mesma substância.

A Figura 27 indica que o grupo cromóforo, foi também resistente à redução, pois não houve diminuição da banda característica, o que pode ser visto durante o processo de redução é que houve aumento da absorbância e deslocamento do comprimento de onda do grupo cromóforo, indicando uma possível alteração na molécula provocada pela redução eletroquímica.

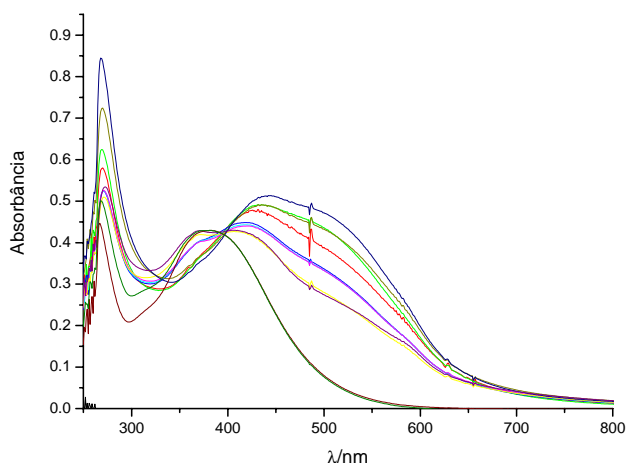


Figura 27. Espectro obtidos durante a redução do corante Disperso Amarelo 9 ($3,5 \times 10^{-5}$ mol/L) em DMF/THF ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$). Espectros registrados a cada 10 minutos de eletrólise até o tempo de 1 horas e 50 minutos sob potencial fixo de $-1,5\text{V}$, sendo o traçado verde escuro o tempo zero de reação e os outros correspondentes à leitura a cada 10 minutos de reação.

Além do solvente DMF, testou-se o comportamento de oxidação e de redução do Disperso Amarelo 9 em DMSO.

Na presença deste solvente, o perfil espectrométrico durante a reação de oxidação foi um pouco diferente, pois ocorreu uma diminuição na banda característica de 400nm, e deslocamento para 380 nm (Figura 28).

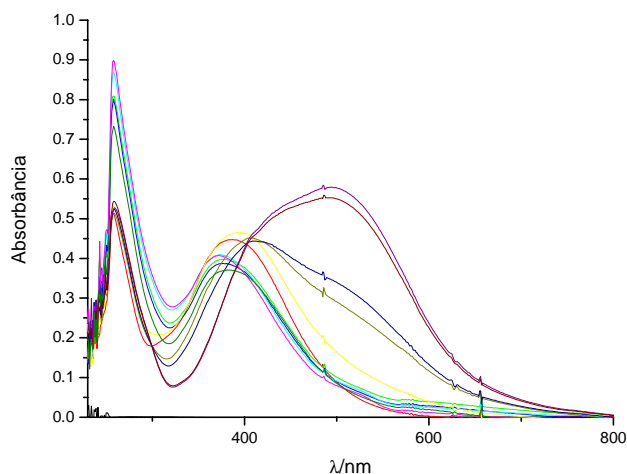


Figura 28. Espectro obtidos durante a oxidação do corante Disperso Amarelo 9 ($3,5 \times 10^{-5}$ mol/L) em DMSO/THF ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$). Espectros registrados a cada 10 minutos de eletrólise até o tempo de 1 hora e 50 minutos sob potencial fixo de $-1,5\text{V}$, sendo o traçado vermelho o tempo zero de reação e os outros correspondentes à leitura a cada 10 minutos de reação.

A Figura 28 mostra que nos tempos de 1 hora e 30 e 1 hora e 40 minutos de oxidação, uma nova banda aparece em 500 nm com uma absorbância de aproximadamente 0,6 nm, sendo provável indício de que possa ter ocorrido a formação de uma nova substância que absorve em outro comprimento de onda.

Nos últimos 10 minutos de eletrólise ocorre o deslocamento da banda de 500 nm para 400 nm seguida de diminuição de absorbância de 0,6 para aproximadamente 0,35. Sugere-se então que a nova banda formada em 500 nm possa ser uma formação radicalar que logo se desestabiliza, originando um composto com menor absorbância que o composto original.

Os resultados apresentados pela Figura 29 sugerem que a redução do Disperso Amarelo 9 em DMSO tenha ocasionado quebra do grupamento cromóforo pois ocorre decaimento da banda em função do tempo de redução espectroeletroquímica, nota-se que o decaimento é de aproximadamente 58 após 2 horas e 20 minutos de eletrólise.

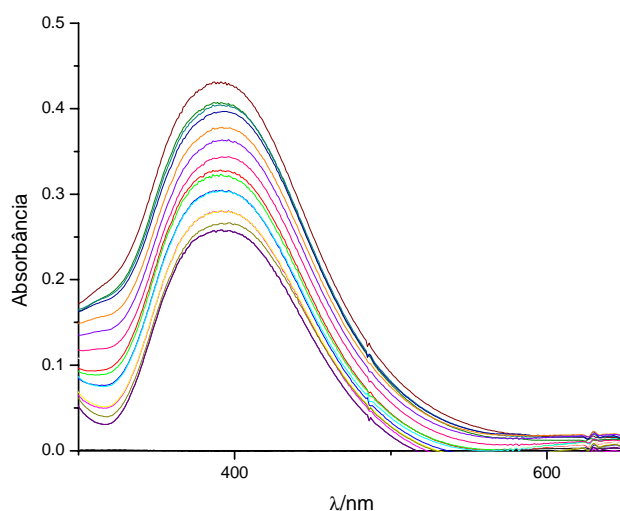


Figura 29. Espectro obtidos durante a redução do corante Disperso Amarelo 9 ($3,5 \times 10^{-5}$ mol/L) em DMSO/THF ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$). Espectros registrados a cada 10 minutos de eletrólise até o tempo de 2 horas e 20 minutos sob potencial fixo de $-1,5\text{V}$, sendo o traçado marrom o tempo zero de reação e os outros correspondentes à leitura a cada 10 minutos de reação.

A Figura mostra o perfil de descoloração, ou seja, o decaimento da banda característica do cromóforo em função do tempo. Os resultados que demonstram a descoloração da solução do corante Disperso Amarelo 9 devido à possível quebra do grupo cromóforo podem ser observados na Figura 30.

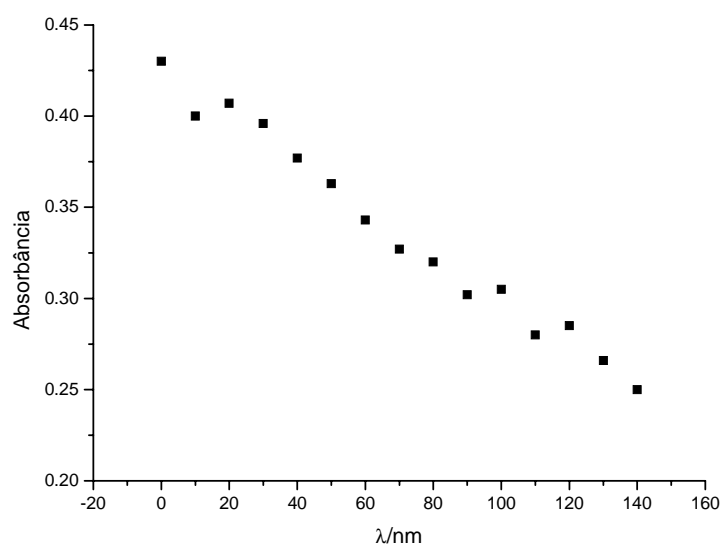


Figura 30 – Descoloração da solução de 3×10^{-5} mol/L do corante Disperso Amarelo 9 em DMSO / TFBTBA sob potencial fixo de $+ 1,5\text{V}$ ($\lambda = 513 \text{ nm}$) redução.

4.4 Reação do corante Sudan III com o DNA e guanosina

Inicialmente foi avaliado o perfil das diferentes concentrações de DNA utilizadas neste estudo (0,015mg/mL, 0,03mg/mL, 0,045mg/mL, 0,075mg/mL e 0,15mg/mL) em meio aquoso de tampão fosfato pH=7,4 (Figura 31). O DNA se caracteriza por duas bandas, uma no comprimento de onda de 215 nm e outra em 259 nm.

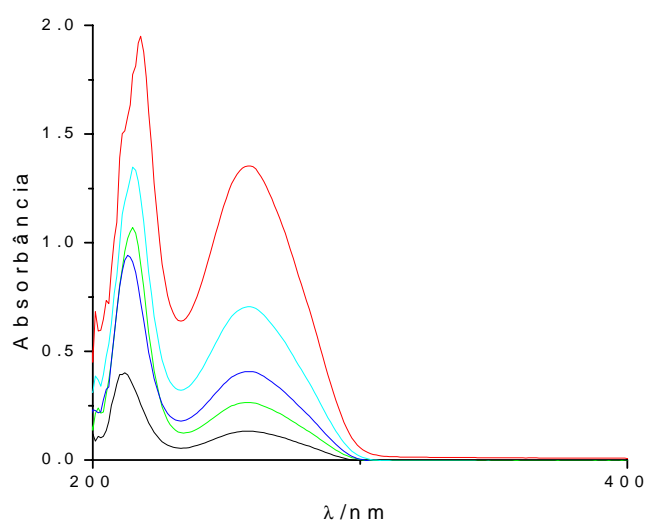


Figura 31. Espectro do DNA em tampão fosfato pH=7,4 nas seguintes concentrações (0,015mg/mL (preto), 0,03mg/mL (verde), 0,045mg/mL (azul escuro), 0,075mg/mL (azul claro) e 0,15mg/mL (vermelho). Partindo de solução estoque de 1,5mg/mL.

Nos experimentos seguintes, fixou-se as seguintes concentrações do corante Sudan III: $2,5 \times 10^{-5}$; $5,5 \times 10^{-5}$ e $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L em tampão fosfato pH=7,4, às quais foram adicionadas as concentrações de 0,015mg/mL, 0,03mg/mL, 0,045mg/mL, 0,075mg/mL e 0,15mg/mL de DNA. As Figuras 32 a 34 mostram os resultados obtidos neste ensaio.

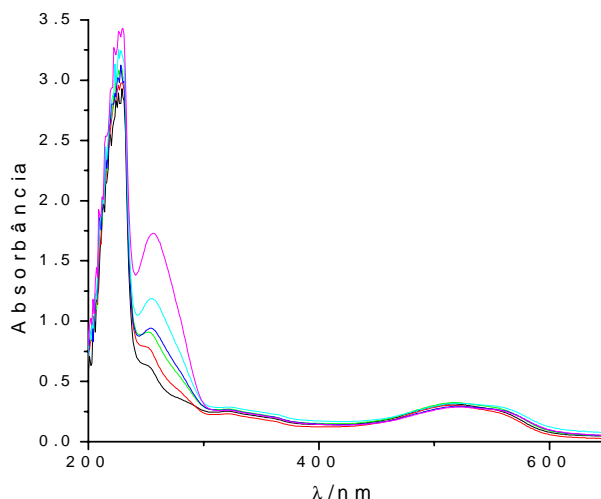


Figura 32. Espectro do corante Sudan III á $2,5 \times 10^{-5}$ mol/L (preto) em tampão fosfato pH= 7,4 com adições crescentes de DNA (0,015mg/mL (vermelho), 0,03mg/mL (verde), 0,045mg/mL (azul escuro), 0,075mg/mL (azul claro) e 0,15mg/mL (rosa)).

Analisando a Figura 32, nota-se que não houve variação nos espectros com a adição de volumes crescentes de DNA. Esse fato poderia ser devido à baixa concentração do corante ($2,5 \times 10^{-5}$ mol/L).

Utilizando a concentração de $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L (Figura 33) do corante verificou-se um pequeno deslocamento no comprimento de onda na banda do cromóforo de 522 nm para 544nm sugerindo que nesta condição ocorre uma fraca interação entre o corante e o DNA, no entanto através desta análise não é possível especificar o tipo de ligação.

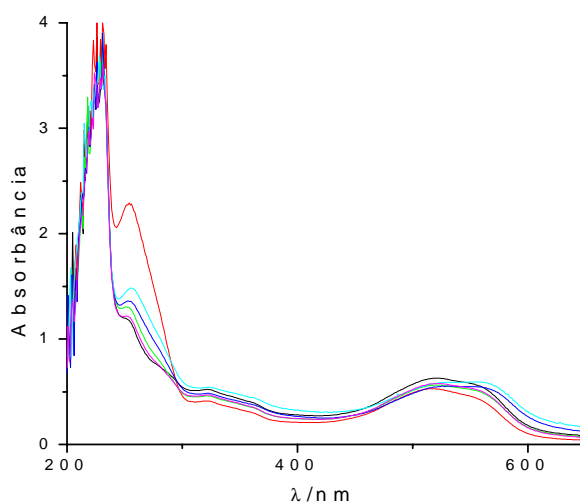


Figura 33. Espectro do corante Sudan III á $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L (preto) em tampão fosfato pH= 7,4 com adições crescentes de DNA (0,015mg/mL (rosa), 0,03mg/mL (verde), 0,045mg/mL (azul escuro), 0,075mg/mL (azul claro) e 0,15mg/mL (vermelho)).

A Figura 34 mostra o corante Disperso Amarelo 9 a $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L. Nesta condição, ocorreu um deslocamento do comprimento de onda de 514 nm para 537 nm, após a adição do DNA. Sugerindo a ligação do DNA com o corante, caracterizada pela mudança espectral do grupo cromóforo.

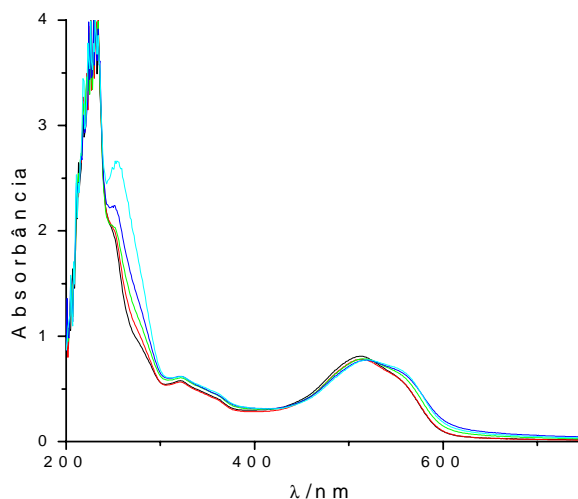


Figura 34. Espectro do corante Sudan III á $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L (preto) em tampão fosfato pH=7,4 com adições crescentes de DNA(0,015mg/mL (rosa), 0,03mg/mL (vermelho), 0,045mg/mL (verde), 0,075mg/mL(azul escuro) e 0,15mg/mL (azul claro).

Os experimentos foram repetidos em DMSO, na tentativa de melhor visualizar a ligação do DNA ao corante. A Figura 35 mostra o perfil dos diferentes volumes de DNA dissolvido em DMSO.

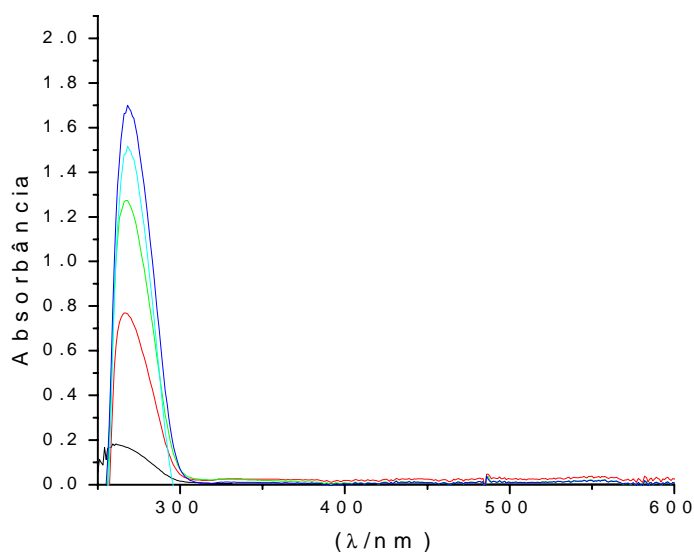


Figura 35. Solução de DNA em 2mL de DMSO. Partindo-se de solução estoque DNA á 1,5mg/mL têm-se: (0,015mg/mL (preto), 0,03mg/mL (vermelho), 0,045mg/mL (verde), 0,075mg/mL(azul claro) e 0,15mg/mL (azul escuro).

Foi utilizada a concentração $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L do corante e diferentes volumes de DNA e os resultados estão mostrados na Figura 36.

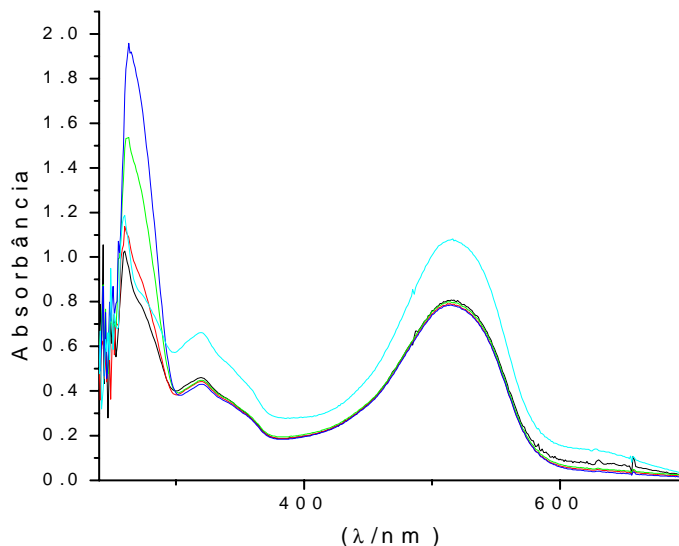


Figura 36. Espectro do corante Sudan III á $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L (azul claro) em DMSO, com adições crescentes de DNA (0,015mg/mL (rosa), 0,03mg/mL (azul claro), 0,045mg/mL (vermelho), 0,075mg/mL (verde) e 0,15mg/mL (azul escuro)).

Observa-se que a adição de diferentes alíquotas de DNA ao corante Sudan III acarretou diminuição da banda do cromóforo em 515 nm, que independente da dose de DNA bovino adicionado à solução, portanto, a interação entre o cromóforo e o DNA parece ser constante, pois os valores de absorvância não se alteram.

Em 260 nm ocorre variação da absorvância em função do aumento do volume de DNA adicionado, nota-se que os volumes apresentam picos maiores que os do corante enquanto (0,015mg/mL, 0,03mg/mL, 0,045mg/mL, 0,075mg/mL e 0,15mg/mL. Volumes inferiores a esses parecem não acarretar mudanças consideráveis no espectro. Logo, de acordo com a análise sugere-se que ocorre interação entre o corante Sudan III e o DNA e parece que essa alteração é estável e independe de concentrações do DNA.

Reação do Sudan III com a base nitrogenada guanósina

Nossos resultados mostraram que o Sudan III forma uma ligação estável com o DNA. Assim, foi investigada a ligação deste corante com uma base específica do DNA, a guanósina.

A Figura 37 demonstra o comportamento da guanósina á 0,44mg/mL, o pico absorve em 252 nm e têm absorvância = 1,06.

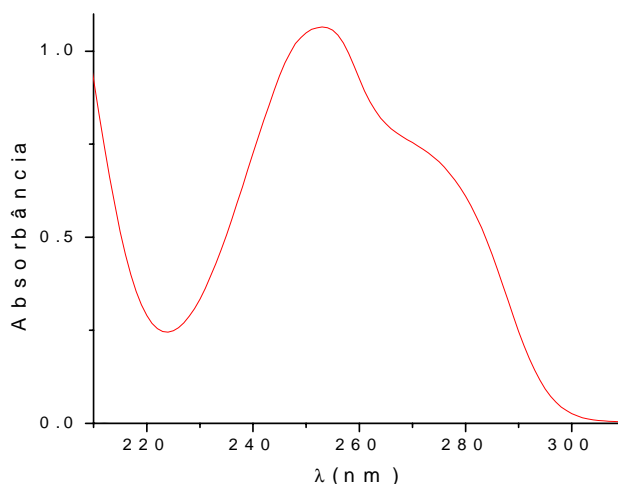


Figura 37: Comportamento da guanosina á 0,44mg/mL em meio aquoso.

A Figura 38 mostra que o corante Sudan III ($5,5 \times 10^{-5}$ mol/L) em DMSO reage com a base nitrogenada guanosina á 0,00088 mg/mL, pois nota-se que após a adição da guanosina, o pico do cromóforo desloca de 513 nm para 537 nm. Observa-se também que a absorvância do corante puro é de 0,73 e quando a guanosina esta muda para 0,69. Tal mudança espectral sugere que o corante nas condições estabelecidas é capaz de formar um aducto com a base nitrogenada em questão.

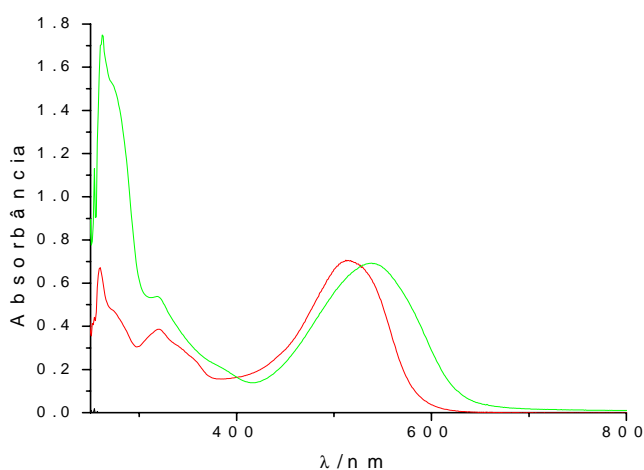


Figura 38. Espectro do corante Sudan III a $5,5 \times 10^{-5}$ mol/L (vermelho) em DMSO e após a adição de 0,00088mg/mL (verde).

Além das variações espectrais, visualmente foi notada a alteração da coloração inicialmente vermelha do Sudan III para roxo intens, que permaneceu estável por 24 horas, sendo descartada após esse período. Ressalta-se que a solução de guanosina é incolor. Assim, esta alteração de coloração já era um indício da interação entre o corante e a base nitrogenada, que foi confirmada por meio das análises espectrofotométricas.

4.5 Reação do corante Disperso Amarelo 9 com o DNA e guanósina

O estudo abaixo investigou a possibilidade de ligação do DNA com o Disperso Amarelo 9. Para tanto, foram empregadas as seguintes concentrações de DNA 0,02mg/mL, 0,04mg/mL, 0,06mg/mL, 0,1mg/mL e 0,2mg/mL, ilustradas na Figura 39.

Assim como no experimento realizado para o corante Sudan III, fixou-se o corante Disperso Amarelo 9 nas seguintes concentrações 3×10^{-5} ; 5×10^{-5} e 1×10^{-4} mol/L em tampão fosfato pH=7,4, às quais foram adicionadas as concentrações de DNA citadas acima. As Figuras 40 á 42 mostram os resultados obtidos neste ensaio.

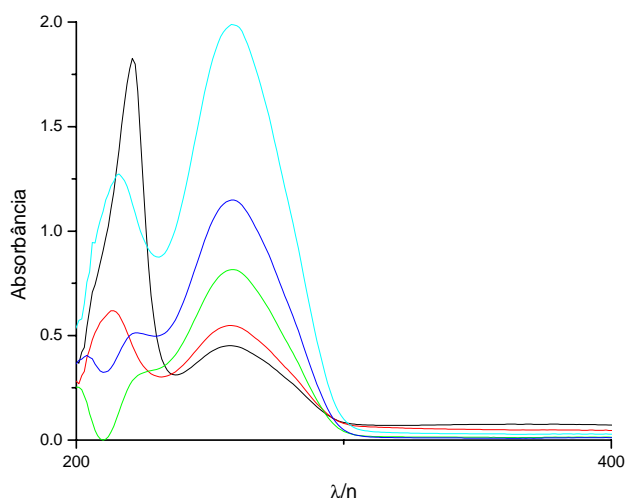


Figura 39. Espectro das soluções de DNA em tampão fosfato pH=7,4 nas seguintes concentrações crescentes:(0,02mg/mL(preto), 0,04mg/mL(vermelho), 0,06mg/mL(verde), 0,1mg/mL(azul escuro) e 0,2mg/mL (azul claro) .Partindo de solução estoque de 2mg/mL.

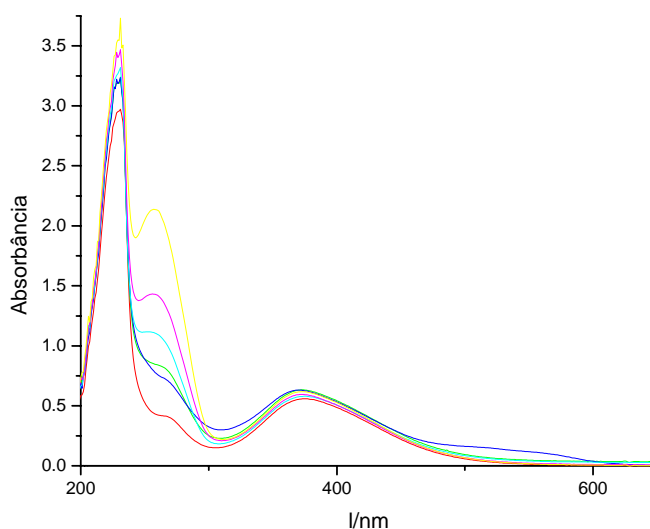


Figura 40. Espectro do corante Disperso Amarelo 9 á 3×10^{-5} mol/L(vermelho) em tampão fosfato pH= 7,4,após a reação com concentrações crescentes de DNA: (0,02 mg/mL(azul escuro), 0,04 mg/mL(verde),0,06mg/mL(azul claro),0,1mg/mL(rosa) e 0,2mg (amarelo). Partindo de solução estoque de 2mg/mL.

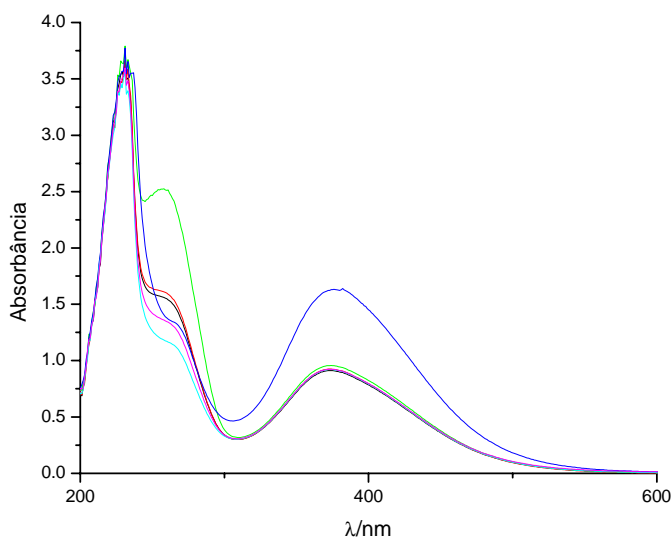


Figura 41. Espectro do corante Disperso Amarelo 9 á 5×10^{-5} mol/ L⁻¹ (azul escuro) em tampão fosfato pH= 7,4,e alíquotas crescentes de DNA nas seguintes concentrações: (0,02 mg/mL(azul claro), 0,04 mg/mL(rosa),0,06mg/mL(preto),0,1mg/mL(vermelho) e 0,2mg (verde). Partindo de solução estoque de 2mg/mL.

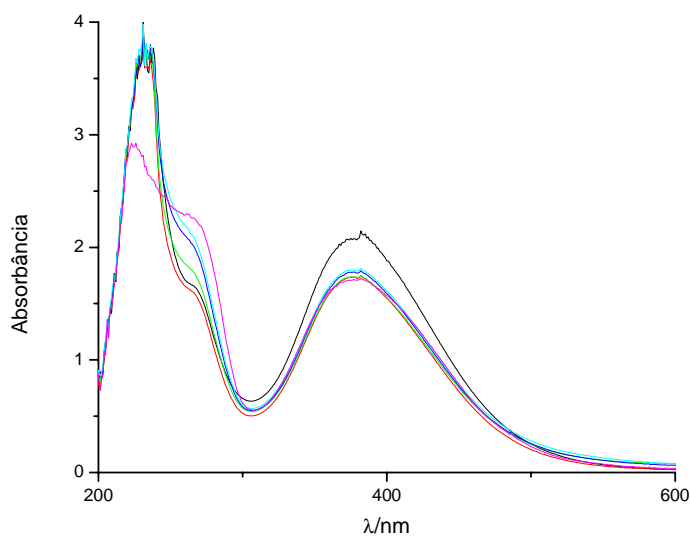


Figura 42. Espectro do corante Disperso Amarelo 9 III á 1×10^{-4} mol/L(preto) em tampão fosfato pH= 7,4,e alíquotas crescentes de DNA nas seguintes concentrações: (0,02 mg/mL(vermelho), 0,04 mg/mL(verde),0,06mg/mL(azul escuro),0,1mg/mL(azul claro) e 0,2mg (rosa). Partindo de solução estoque de 2mg/mL.

Esse teste indicou que a proporção entre DNA e a concentração do corante Amarelo Disperso 9 é importante para que ocorra a interação entre o DNA e o corante. Pois, na concentração fixada a 3×10^{-5} mol L⁻¹ independente da alíquota de DNA adicionada não ocorreu alteração no grupo cromóforo á 375 nm. No entanto, em maiores concentrações do

corante ocorreu redução da absorbância do grupo cromóforo independente da quantidade de DNA.

4.6 Comportamento do DNA em DMSO para Disperso Amarelo 9

A seguir foi investigado o comportamento do corante Disperso Amarelo 9 em DMSO a fim de melhor analisar e compreender a possibilidade de ligação com o DNA *in vitro*.

Foram também empregadas concentrações variáveis de DNA, a (0,02mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,06mg/mL, 0,1mg/mL e 0,2 mg/mL para traçar o comportamento espectrofotométrico do mesmo (Figura 43).

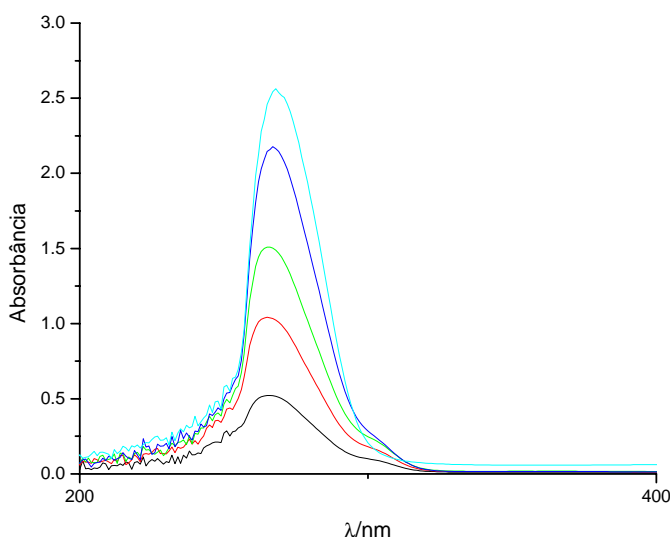


Figura 43. Espectro do DNA em DMSO nas seguintes concentrações crescentes: (0,02mg/mL (preto), 0,04mg/mL (vermelho), 0,06mg/mL (verde), 0,1mg/mL (azul escuro) e 0,2mg/mL (azul claro) .Partindo de solução estoque de 2mg/mL.

Tendo traçado o perfil das soluções de NA, foi realizada a reação entre este ácido e o corante à $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e o resultado está apresentado na Figura 44. Observa-se que as adições de 0,02mg/mL, 0,04mg/mL, 0,06mg/mL, 0,1mg/mL e 0,2mg/mL de DNA no Disperso Amarelo 9 não provocaram diminuição da banda do grupo cromóforo portanto sugere-se que a reação não ocorra nestas proporções, no entanto com a adição de 50 e 100 μL colocar concentração de DNA nota-se uma discreta diminuição de 0,8 da banda do cromóforo em 384 nm. Desta forma, nota-se que a diminuição provocada no grupo cromóforo é pequena, sugerindo ausência ou pouca capacidade de interação direta entre o corante e o DNA *in vitro* nas condições testadas.

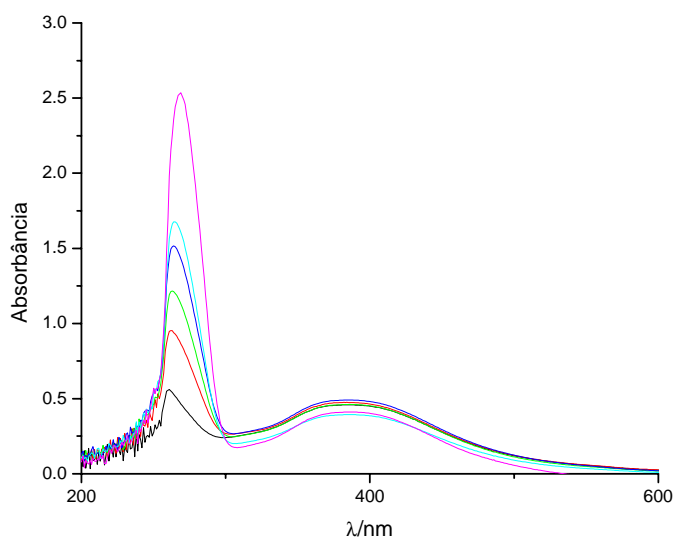


Figura 44. Espectro do corante Disperso Amarelo 9 III á 3×10^{-5} mol/L (preto) em DMSO com alíquotas crescentes de DNA nas seguintes concentrações: (0,02 mg/mL (vermelho), 0,04 mg/mL (verde), 0,06 mg/mL (azul escuro), 0,1 mg/mL (azul claro) e 0,2 mg (rosa). Partindo de solução estoque de 2 mg/mL.

Reação do corante Disperso Amarelo 9 com guanósina

A Figura 45 ilustra o comportamento espectrofotométrico da solução aquosa de guanósina á 1,32 mg/mL. Esta base absorve principalmente em 251 nm tendo duas outras bandas que absorvem em 220 e 273 nm.

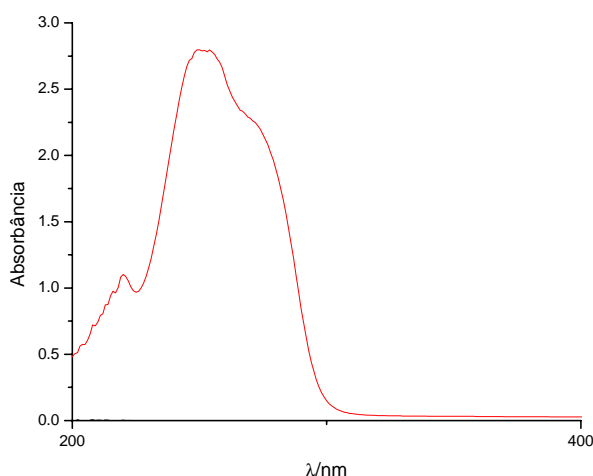


Figura 45. Comportamento da guanósina á 1,32 mg/mL em solução aquosa.

A seguir investigou-se a possibilidade do corante Disperso Amarelo 9 interagir com esta base nitrogenada em diferentes concentrações tais como 0,0132 mg/mL, 0,039 mg/mL e

0,079 mg/mL. A Figura 46 (A,B e C) mostra os resultados obtidos neste ensaio, para concentrações variáveis do corante a : 3×10^{-5} , 5×10^{-5} e 1×10^{-4} mol/L-1, respectivamente com as concentrações crescentes de guanósina citadas acima. De acordo com as análises realizadas supõe-se que o corante Disperso Amarelo 9 não seja capaz de ligar-se na base específica guanósina, pois independente da alíquota de guanósina empregada em concentrações diferentes testadas não houve variação do grupamento azo em 380 nm.

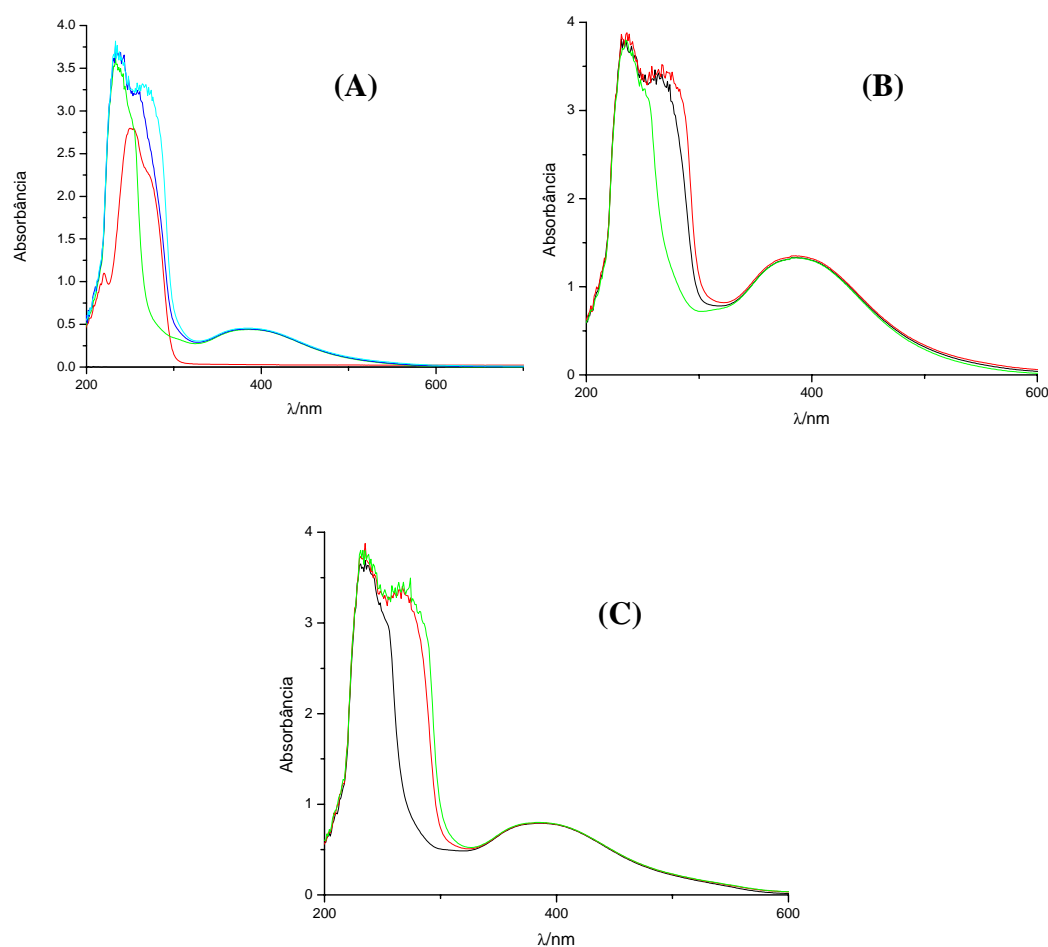


Figura 46. Espectro da reação do corante Sudan III a 3×10^{-5} mol/L (A), 5×10^{-5} mol/L (B) e $1,1 \times 10^{-4}$ mol /L (C), com concentrações variáveis de guanósina.

4.7 Ensaio de mutagenicidade com Salmonella

Corante Sudan III

Inicialmente foi testada a solubilidade do corante Sudan III em DMSO, partindo da concentração de 5mg/placa que é a dose máxima recomendada pela Sociedade Brasileira de Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese Ambiental (SBMCTA) para produtos puros. No entanto, o corante não foi solúvel nesta condição. Assim, foram testadas as concentrações de 4mg/placa, 3mg/placa, 2mg/placa e todas apresentaram resultados insatisfatórios de solubilidade. Sendo assim utilizou-se a dose máxima de 1mg/placa que foi solúvel e partindo desta concentração, foram empregadas doses em intervalos logarítmicos, sendo estes: 1mg/placa, 0,1 mg/placa, 0,01 mg/placa, 0,001 mg/placa e 0,0001 mg/placa. Foram utilizadas as linhagens de *Salmonella* de triagens TA98 e a TA100, além das linhagens YG1042 e a TA1535.

Nestas condições, foram obtidos resultados negativos para todas as linhagens (Figura 47).

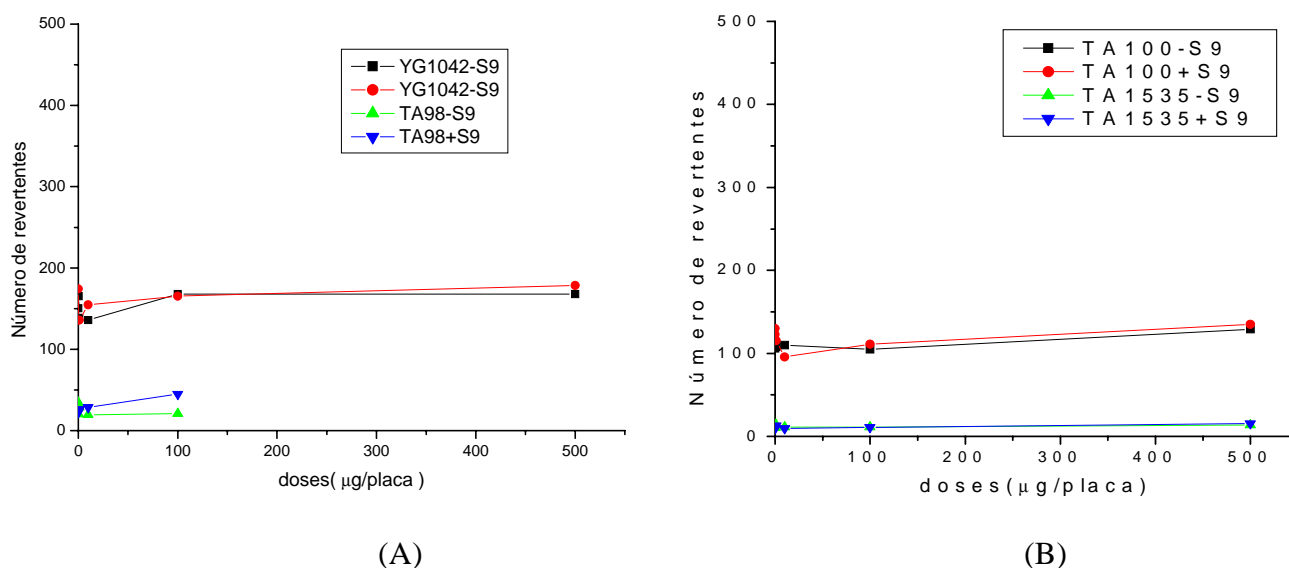


Figura 47. Resultados negativos de mutagenicidade para o corante Sudan III com as linhagens TA98 e YG1042 com e sem ativação metabólica S9 (A) e com as linhagens TA100 e TA1535 com e sem ativação metabólica S9 (B).

Porém, de acordo com a literatura, o Sudan I (Figura 2), que têm estrutura semelhante ao Sudan III foi analisado até a dose de 3mg/placa e apresentou resposta de mutagenicidade

positiva após ativação metabólica S9 para a linhagem TA1538. Neste trabalho, os autores estudaram vários corantes dissolvidos em álcool, acetona e DMSO (ZEIGER *et al.*, 1988; CAMERON *et al.*, 1987).

Assim, na intenção de aumentar a solubilidade do corante Sudan III, tentou-se diluir o corante em proporções diferentes de álcool e DMSO. Partiu-se da concentração de 10% de DMSO e 90% de álcool, até chegar á 70% de DMSO e 30% de álcool. Em seguida estas soluções foram empregadas no teste de viabilidade para verificar se as bactérias poderiam sobreviver nestas condições. Os resultados mostraram que as bactérias foram capazes de crescer em meio alcoólico normalmente. Assim, foi escolhida a proporção 30% álcool e 70% DMSO, pois permitiu a total solubilização de até 2 mg/placa do corante, o qual apresentou uma coloração vermelha intensa.

Inicialmente realizou-se um experimento preliminar utilizando doses em escala logarítmica que pudessem comparar as linhagens TA1535 e TA100 para avaliar a possibilidade de haver mutação do tipo substituição de pares de bases. A Figura 48 mostra o gráfico obtido à partir do ensaio com essas linhagens na ausência e na presença de S9. A partir da análise da Figura 48 nota-se que o Sudan III não foi mutagênico nas condições de ensaio para a linhagem TA100 com e sem ativação metabólica.

Nota-se que para a TA1535, com ativação metabólica foi observada uma atividade mutagênica discreta (0,18 rev/ μ g). Para o ensaio com a linhagem TA1535 na ausência de S9, foi obtida resposta negativa nas condições testadas.

Nossos resultados sugerem que a ativação metabólica no citocromo P-450 (S9) promove a formação de compostos mutagênicos, confirmando os dados apresentados no item 4.1.

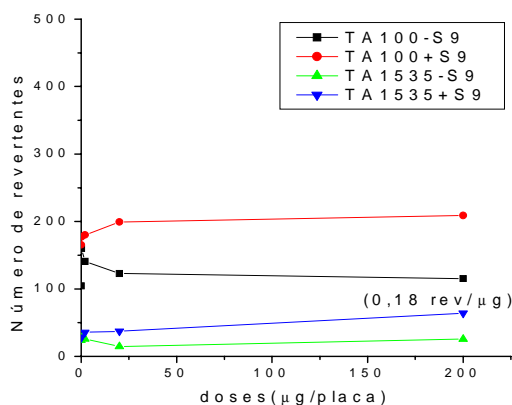


Figura 48. Comparação do perfil de mutagenicidade do corante Sudan III, com as linhagens TA1535 e TA100 com e sem ativação metabólica S9, usando doses em escala logarítmica.

A partir de resultado positivo observado para a linhagem TA1535 na dose 200 $\mu\text{g}/\text{placa}$ com ativação metabólica, foi realizado o estreitamento de dose, a fim de identificar em qual concentração esse efeito se inicia (Figura 49).

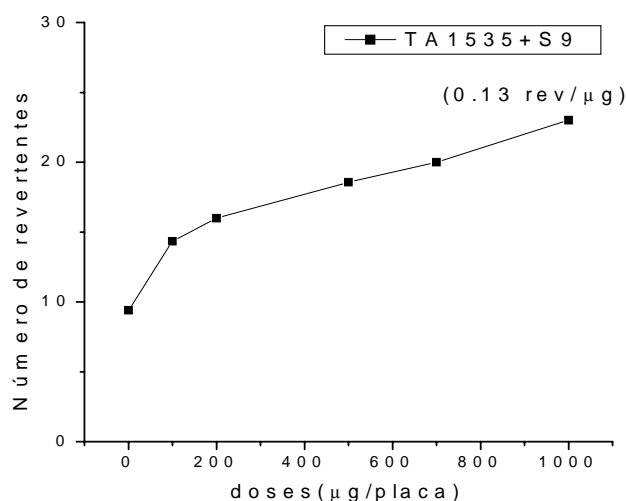


Figura 49. Perfil de mutagenicidade do corante Sudan III, com a linhagem TA1535 com ativação metabólica S9, usando doses em intervalos estreitos.

A Figura 49 mostra que nas condições testadas, o corante Sudan III apresentou baixa potência mutagênica (10 rev/ μg) de acordo com a classificação de Claxton *et al* (1991). Segundo ZEIGER *et al.* (1988) existe uma gama de substâncias que resultam em mutagenicidade positiva utilizando apenas a linhagem TA1535, devido a ausência do plasmídeo pKm101. Tanto a linhagem TA100 quanto a TA1535 contém a mutação his G46 que resultou na substituição de uma leucina (GAG/CTC) por uma prolina (GGG/CCC) sendo um marcador para mutágenos que causam substituição de pares de bases (MARON., AMES., 1983; UMBUZEIRO & VARGAS., 2003). A ausência do plasmídeo pKm101 (responsável pelo sistema de reparo do tipo error prone/ passível de erro) pode ter aumentado a especificidade da mutação.

De acordo com a Figura 50, nota-se que o corante Sudan III nas condições descritas também não apresentou mutagenicidade para as linhagens TA98 e YG1042 na ausência ou presença de ativação metabólica S9.

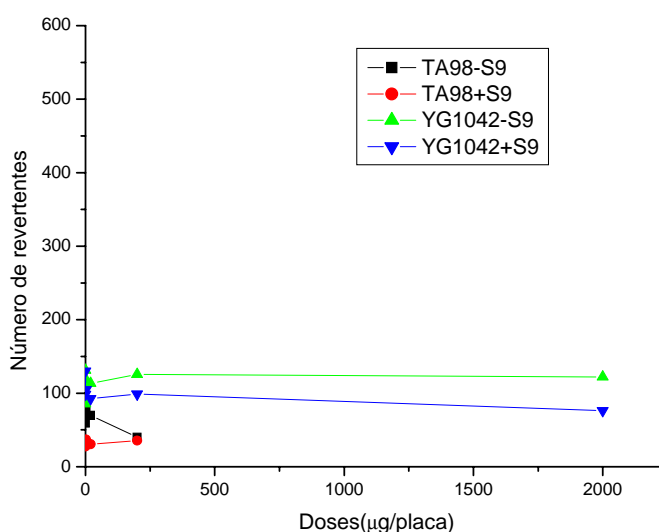


Figura 50. Comparação do perfil de mutagenicidade do corante Sudan III, com as linhagens TA98 e YG1042 com e sem ativação metabólica S9, usando doses em escala logarítmica.

Considerando a fraca resposta obtida para a linhagem TA1535 e negativa para as demais linhagens testadas, sugerimos que a substituição de pares de base e deslocamento do quadro de leitura não sejam os mecanismos de mutagenicidade mais importantes para o Sudan III. Porém, como o Sudan I é carcinogênico (STIBOROVÁ et al., 2002) e altamente mutagênico, suspeitou-se que o Sudan III também poderia ter ligação ao DNA por outro mecanismo. Essa suspeita foi confirmada pela ligação estável do Sudan III à guanosina, relatada no item 4.3.

Corante Disperso Amarelo 9

Para este corante também foi realizado um experimento preliminar, com as mesmas linhagens utilizadas para o Sudan III, empregando doses logarítmicas. A dose de 5000 µg/placa, recomendada pela SBMCTA foi testada e o corante apresentou-se solúvel nessa concentração, no entanto ao verter a solução, ocorreu precipitação do composto na placa para todas as linhagens testadas e por isso esta dose foi descartada.

Neste experimento, o corante Disperso amarelo 9 foi mutagênico também para a linhagem TA1535, com e sem ativação metabólica (Figura 51), no entanto a resposta foi mais intensa na presença de S9, tal resultado sugere que a metabolização, ou seja a ação das enzimas do Citocromo P450 bioativam o composto. Para a linhagem TA100, a resposta foi negativa (Figura 51), nas condições do ensaio.

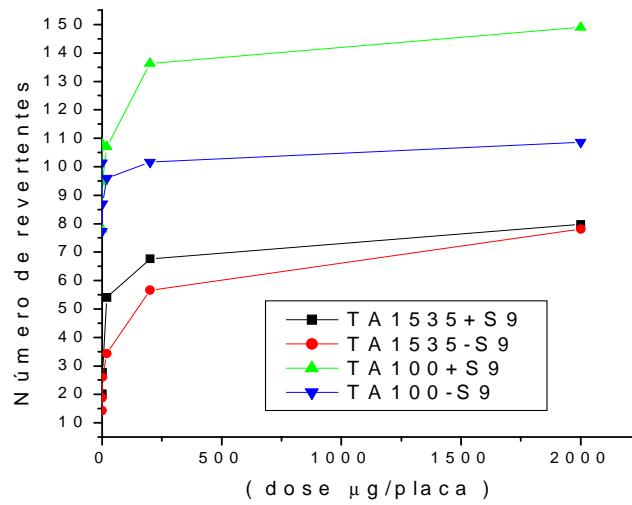


Figura 51. Comparação do perfil da mutagenicidade do corante Disperse Yellow9 com as linhagens TA100 e TA1535 com e sem ativação metabólica S9 usando doses em escala logarítmica.

A resposta também foi positiva para a linhagem YG1042 com e sem ativação metabólica e negativa para a TA98 (Figura 52). A linhagem YG1042 é superprodutora de nitroredutases, como o corante Disperse Amarelo 9 é composto de grupo nitro, sugere-se que estas enzimas agiram no grupo específico gerando produtos mais tóxicos que o original.

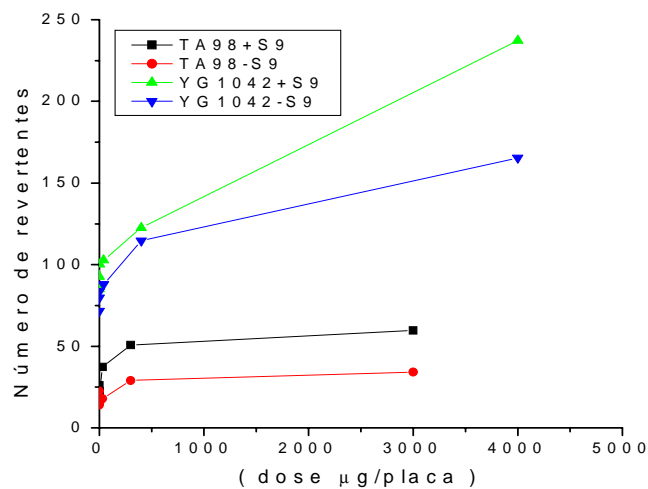


Figura 52. Comparação do perfil da mutagenicidade do corante Disperse Yellow9 com as linhagens TA98 e YG1042 com e sem ativação metabólica S9 usando doses em escala logarítmica.

Para determinar a partir de que dose a mutagenicidade começa a manifestar, foi feito o estreitamento de doses nos casos de respostas positivas e os resultados estão apresentados na Figura 53.

Observa-se que a potência mutagênica deste corante com a linhagem YG1042 na presença de S9 (0,74 rev/ μ g) é duas vezes maior que com a linhagem TA98 (0,35 rev/ μ g). Somando este resultado à resposta negativa obtida com a linhagem TA100, fica clara a importância da nitroredução na mutagenicidade desse corante. A capacidade de bioativação deste corante após a biotransformação é confirmada pelo aumento da potência em quase 15 vezes na presença de S9.

Para a linhagem TA1535 o sistema de metabolização exógeno (S9) aumenta a potência em 1,75 vezes, passando de 0,35 para 0,20 revertentes/ μ g.

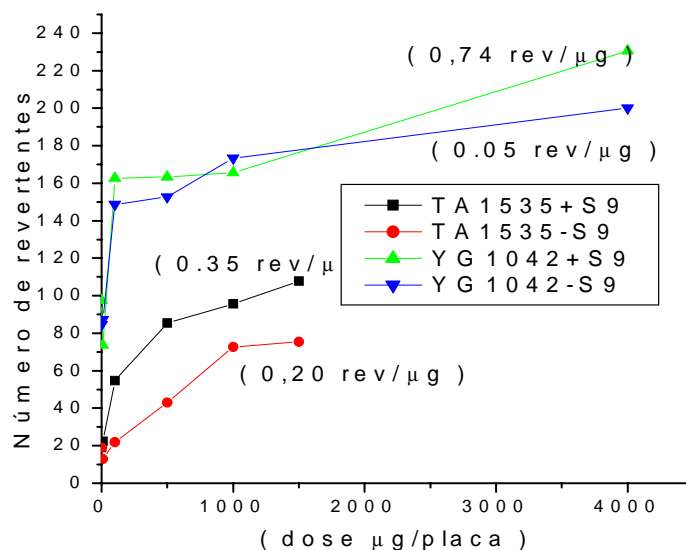


Figura 53. Comparação do perfil da mutagenicidade do corante Disperse Yellow9 com a linhagem TA1535 e YG1042 com e sem ativação metabólica S9 usando intervalos estreitos. Os números entre parênteses foram gerados como valores de inclinação da reta, de acordo com o modelo Bernstein et al. (1982) e representa a potência do composto.

4.8 Ensaio de Viabilidade e Toxicidade celular

4.8.1 Avaliação da morte celular pelos testes com o Azul de Tripano e pela concentração de ácido láctico para o corante Sudan III

Para este ensaio foram utilizadas duas técnicas: Viabilidade celular com Azul de Tripano e produção de ácido láctico, utilizando tempos de incubação diferentes (1, 2, 3 e 24 horas), apresentados nas Figuras 54 á 57.

De acordo com a Figura 54 (A) observa-se que o corante Sudan III nas concentrações testadas apresentou efeito dose-resposta de morte dos condrócitos após incubação de 1 hora a 37° C, essa relação é bastante clara uma vez que para a dose máxima testada (0,4 mg/mL), cerca de 30% dos condrócitos apresentaram morte celular. No mesmo experimento, testou-se a dose máxima de 4 mg/mL, no entanto essa dose precipitou na câmara de Neubauer impossibilitando a contagem de células.

A análise da Figura 54 (B) indica que a produção de ácido láctico diminuiu significativamente apenas para as maiores concentrações 0,4 e 4 mg/mL. Neste ensaio foi possível avaliar a dose de 4 mg/mL, pois quando as células são centrifugadas, ocorre deposição do corante Sudan III no eppendorf, e os 10mL de volume de amostra não contém precipitação do corante, permitindo dessa forma avaliação do dose mais alta.

Quando ocorre morte celular, observa-se redução da produção de ácido láctico. Provavelmente a quantidade de células mortas induzidas geradas pela adição do corante a 0,0004, 0,004 e 0,04 mg/mL (Figura 54A) seja incapaz de produzir diminuição significativa de produção de ácido láctico (Figura 54B), o que explicaria a aparente discrepância entre os gráficos da Figura 54.

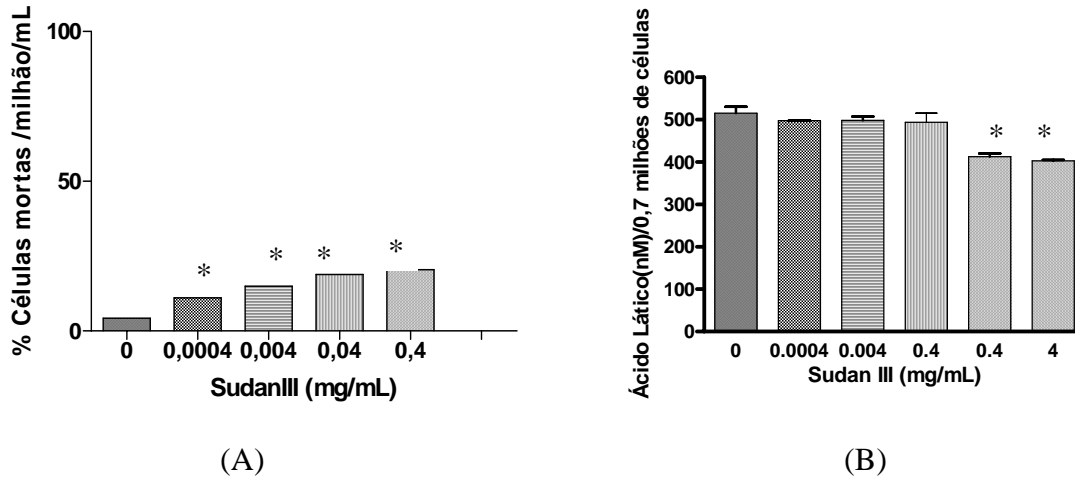


Figura 54. Avaliação da viabilidade celular por (A) Azul de Tripano e (B) produção de Ácido Láctico pelos condrócitos usando concentrações de 0,0004 -4 mg/mL de corante Sudan III, pelo período de incubação de 1 hora a 37 °C. Análise estatística * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$.

Os resultados dos ensaios com 2 horas de incubação estão representados na Figura 55.

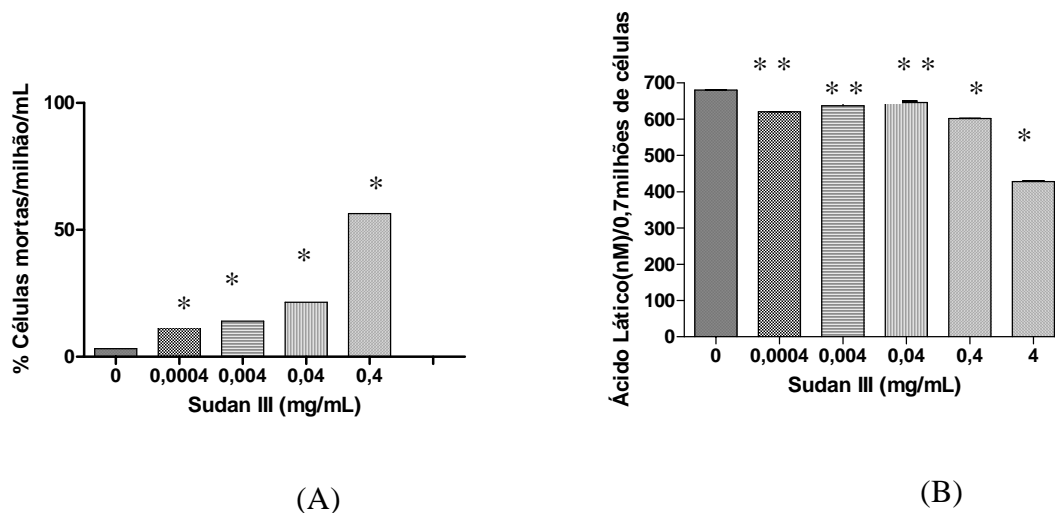


Figura 55. Avaliação da viabilidade celular por (A) Azul de Tripan e (B) produção de Ácido Láctico pelos condrócitos usando concentrações de 0,0004 -4 mg/mL do corante Sudan III, pelo período de incubação de 2 horas a 37 °C. Análise estatística * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$.

Segundo a Figura 55 (A) observa-se que após a incubação de 2 horas do corante Sudan III à 37 graus Celsius, a maior dose utilizada do composto (0,4 mg/mL) levou a morte de cerca de 60% dos condrócitos, ou seja, cerca de 2 vezes mais que o observado após incubação de 1 hora Figura 54(A), tal relação sugere que pode haver não apenas dose – resposta para exposição do corante Sudan III aos condrócitos, mas também que esteja ocorrendo toxicidade dependendo do tempo de exposição. No entanto, para as demais concentrações testadas, não

ocorrem grandes mudanças quando há uma exposição mais prolongada. Todas as doses testadas apresentaram uma indução de morte celular significativa ($p < 0,01$) em relação ao controle.

A produção de ácido láctico após o tratamento com 4 mg/mL se reduziu significativamente ($p < 0,01$) a cerca de 30% quando comparada ao grupo controle (Figura 55 (B)).

Os dados apresentados na Figura 56 (A) referem-se ao tratamento por 3 horas de exposição das células aos corantes. Nota-se que para a dose máxima de 0,4mg/mL ocorreu um pequeno incremento no número de condrócitos mortos (cerca de 65%) quando comparado ao tempo de incubação de 2 horas. Sendo aproximadamente a mesma porcentagem para as concentrações menores em todos os períodos de incubação testados (1, 2 e 3 horas).

No entanto, como pode ser observado, na Figura 56 (B) a produção de ácido láctico após três horas de incubação tem uma queda significativa em relação ao controle para todas as doses testadas ($p < 0,01$), o que não era possível observar para as menores doses com um menor tempo de incubação, demonstrando que este parâmetro é menos sensível do que o ensaio por azul de tripano, já que necessita de um maior tempo de incubação para se mostrar significativo.

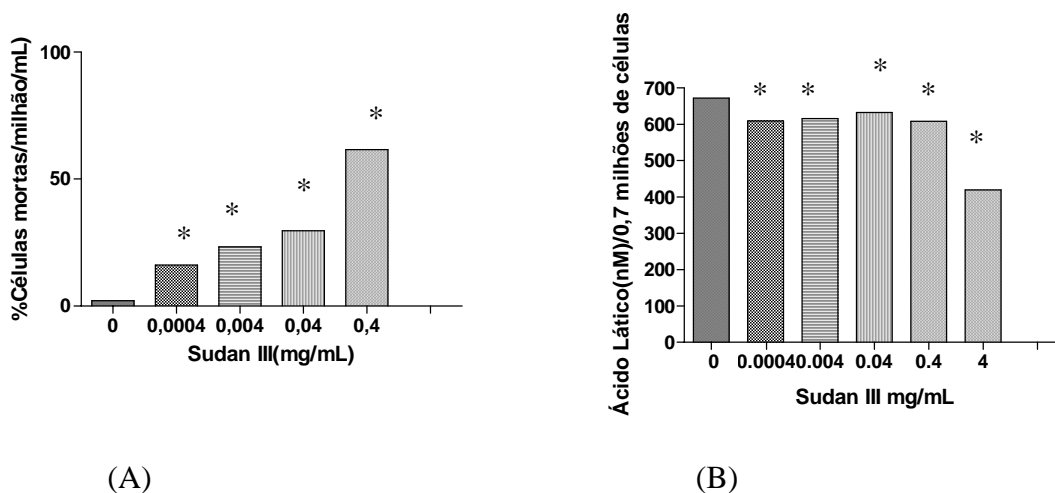


Figura 56. Avaliação da viabilidade celular por (A) Azul de Tripan e (B) produção de Ácido Láctico pelos condrócitos usando concentrações de 0,0004-4 mg/mL do corante Sudan III, pelo período de incubação de 3 horas a 37 °C. Análise estatística * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$.

Devido à aparente dependência de toxicidade em relação ao tempo de exposição ao corante, observada principalmente para o teste de produção de ácido láctico, realizou-se o mesmo experimento com 24 horas de incubação.

Observa-se na figura 57 (A) e (B) um aumento da morte celular após 24 horas de incubação, por ambas as técnicas chegando a 90% de morte celular para a concentração de 0,4 mg/mL, e uma diminuição na produção de ácido lático mais acentuada para todas as concentrações testadas. Tais dados demonstram a toxicidade deste corante para os condrócitos testados.

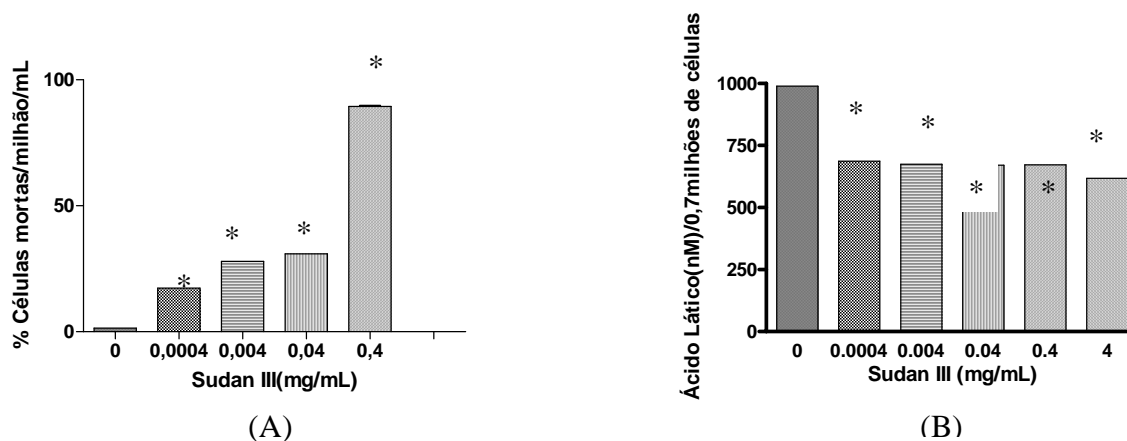


Figura 57. Avaliação da viabilidade celular por (A) Azul de Tripán e (B) produção de Ácido Lático pelos condrócitos usando concentrações de 0,0004-4 mg/mL do corante Sudan III, pelo período de incubação de 24 horas a 37 °C. Análise estatística * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$.

4.8.2 Avaliação da morte celular pelos testes com o Azul de Tripano e pela concentração de ácido lático para o corante Disperse Yellow 9

Devido à alta solubilidade do corante, foi realizada solubilização em concentração máxima de 20 mg/mL. Utilizando assim uma escala logarítmica a partir da dose inicial de 0,002 mg/mL.

Da mesma forma que para o corante Sudan III o teste com o azul de tripano foi limitado à concentração de 2 mg/mL devido à precipitação na câmara de Neubauer com concentrações maiores.

A Figura 58 (A) e (B) demonstra que após 1 hora de incubação com o corante Disperso Amarelo 9, todas as concentrações testadas apresentaram indução de morte celular, em ambas as técnicas, mais evidenciada porém, pela diminuição na produção de ácido lático pelas maiores concentrações de corante testadas.

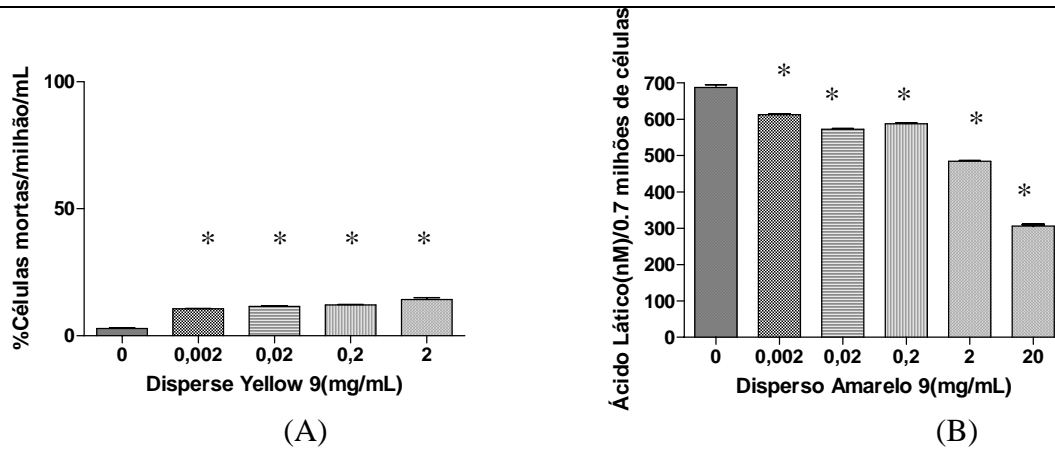


Figura 58. Avaliação da viabilidade celular por (A) Azul de Tripán e (B) produção de Ácido Láctico pelos condrócitos usando concentrações de 0,002-20 mg/mL do corante Disperso Amarelo 9 pelo período de incubação de 1 hora a 37 °C. Análise estatística * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$.

Com os experimentos posteriores, utilizando os tempos de incubação de 2, 3 e 24 horas, observou-se uma indução de morte celular significativa ($p < 0,05$) para as concentrações a partir de 0,02 mg/mL, pelas duas técnicas utilizadas. Demonstrou-se ainda que estes efeitos tóxicos aos condrócitos ocorrem de forma dose-dependente e que se intensificam com o maior tempo de exposição (Figuras 59, 60 e 61), chegando a 70% de morte celular para a concentração de 2 mg/mL após 24 horas de incubação.

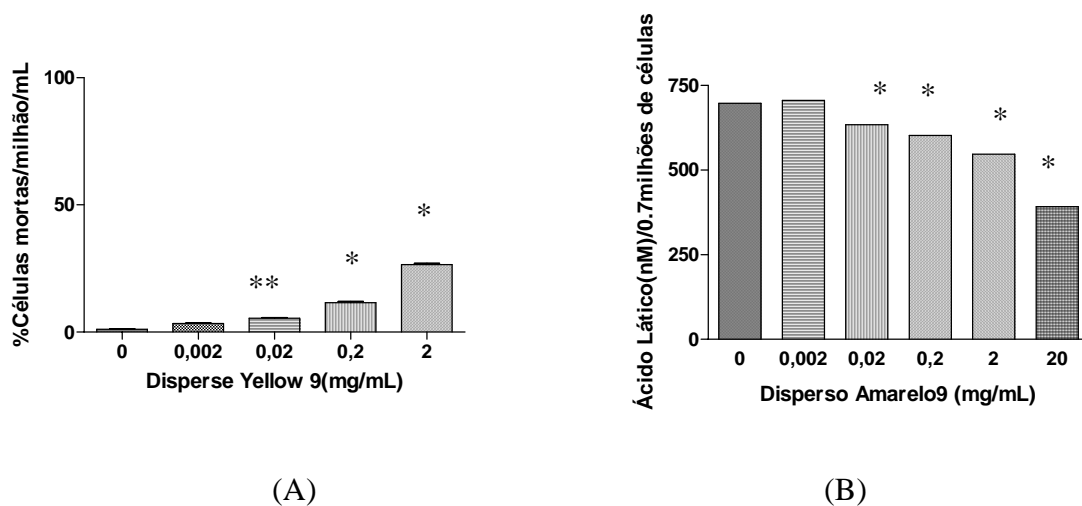


Figura 59. Avaliação da viabilidade celular por (A) Azul de Tripán e (B) produção de Ácido Láctico pelos condrócitos usando concentrações de 0,002-20 mg/mL do corante Disperso Amarelo 9, pelo período de incubação de 2 horas a 37 °C. Análise estatística * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$.

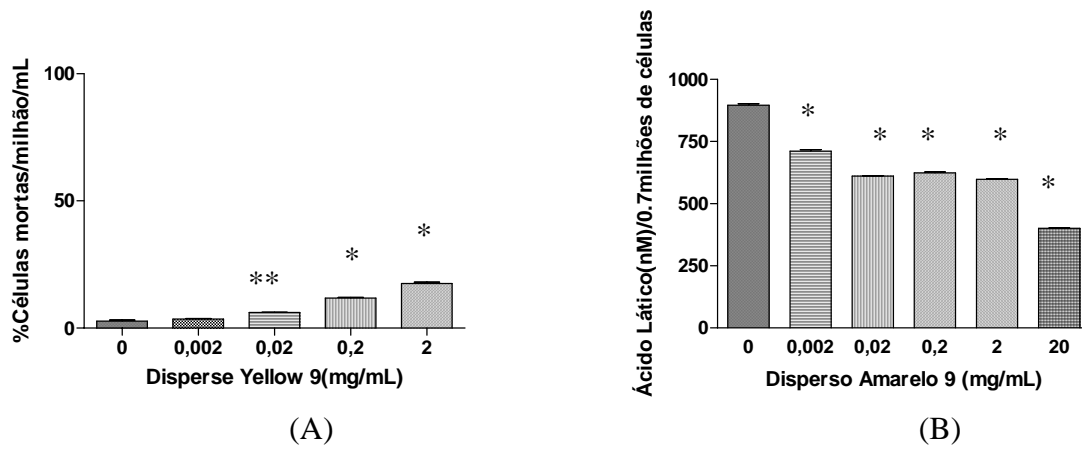


Figura 60. Avaliação da viabilidade celular por (A) Azul de Tripán e (B) produção de Ácido Lático pelos condrócitos usando concentrações de 0,002-20 mg/mL do corante Disperso Amarelo 9, pelo período de incubação de 3 horas a 37 °C. Análise estatística * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$.

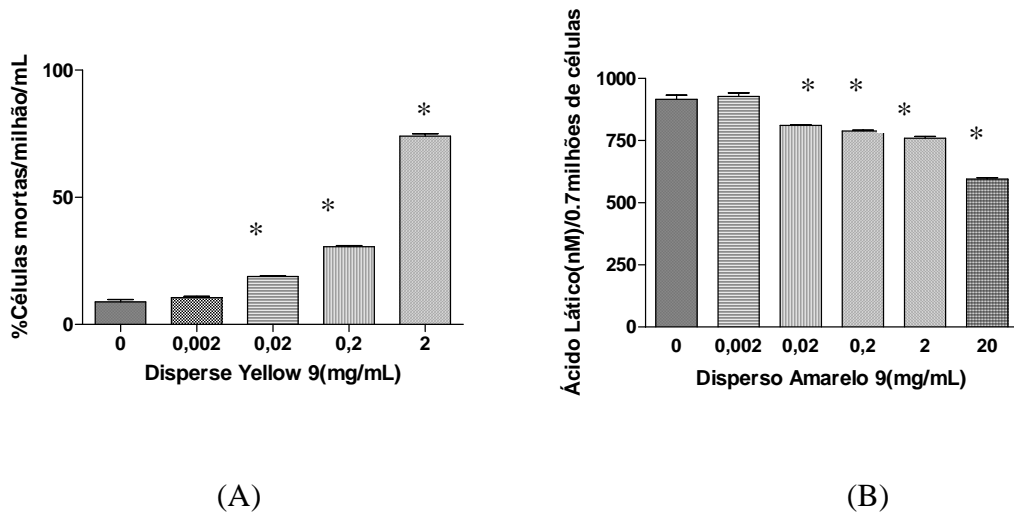


Figura 61. Avaliação da viabilidade celular por (A) Azul de Tripán e (B) produção de Ácido Lático pelos condrócitos usando concentrações de 0,002-20 mg/mL do corante Disperso Amarelo 9, pelo período de incubação de 24 horas a 37 °C. Análise estatística * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$.

5. CONCLUSÕES

- O teste espectroeletróquímico foi bem validado, permitindo que se obtenham produtos de redução e oxidação que deverão ser posteriormente testados no teste de Ames;
- As condições de oxidação e redução eletroquímicas foram capazes de modificar o grupamento cromóforo tanto do corante Sudan III quanto do Disperso amarelo 9, e esse efeito é esperado em organismos vivos, podendo formar derivados tóxicos;
- A alteração dos grupos cromóforos dos dois corantes estudados após a reação com sistema exógeno de metabolização (S9), confirma que este efeito pode ocorrer em células que possuem o sistema Citocromo P-450;
- Os corantes Sudan III e Disperso Amarelo 9 possuem perfil diferente de oxidação e redução dependendo do solvente utilizado;
- O corante Sudan III é capaz de se ligar ao DNA de forma estável, mais especificamente com a base nitrogenada guanosina. Portanto, a formação de adutos parece ser o mecanismo de dano genético mais importante, tendo em vista os resultados negativos e fracamente positivo para a linhagem TA1535 no ensaio de mutagenicidade com Salmonella/microsossom;
- O corante Disperso Amarelo 9 reage fracamente com o DNA e não é capaz de se ligar à guanosina. Portanto, a formação de adutos não é um mecanismo relevante de mutagenicidade para este composto;
- O mecanismo mais importante de mutagenicidade para o corante Disperso Amarelo 9 é a substituição de pares de bases, pois este é o dano detectado pelas linhagens TA1535 e YG1042;
- A biotransformação, seja por meio das isoformas do citocromo P450, seja por nitroreduases são muito importantes para o efeito tóxico observado para o corante Disperso Amarelo 9.

- O corante Sudan III induziu a morte celular de condrócitos. Esse efeito mostrou-se dependente do tempo de incubação, tendo em 24 horas induzido cerca de 90% de morte celular para a concentração de 0,4 mg/mL. Este perfil tóxico também foi observado para o corante Disperso amarelo 9 que também provocou aumento de morte celular em decorrência do tempo de incubação e concentração.

BIBLIOGRAFIA

About fiscal marketing of fuels in European Union, <http://www.euromarket.com/>.

AMES, B.N (1971). The detection of chemical mutagens with enteric bacteria, in: A Hollaender (Ed.), **Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection** vol.1 Plenum, New York, pp 267-282).

ASPLAND , J.R., 1997. Textile Dyeing and Coloration, American Association of Textile **Chemists and Colorists**, RTP,NC.

BARHAM, D, TRINDER, P: An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. **Analyst** 97:142, 1972.

BARON. J;REDICK, J;GUENERICH.F.P. (1981) An immunohistochemical study on the localizations and distribution of phenobarbital- and- 3-methylcholanthrene-inducible cytochromes P-450 within the livers of untreated rats. **The journal of Biological Chemistry**,256,5931-5937.

BERNSTEIN, L., KALDOR, J., MCCANN, J., PIKE, M.C.. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from Salmonella test. **Mutation Research**, v.97, p.267–281, 1983.

CAMERON, T.P., HUGHES,T.J., KIRBY,P.E.,FUNG, V.A and DUNKEL, V.C. Mutagenic activity of 27 dyes and related chemicals in the Salmonella/ micrososome and mouse lymphoma TK+/- assays.**Muta.Res**,189:223-261,1987.

CHADWICK, R.W., GEORGE, S.E., CLAXTON, L., 2000. Comparison of the mutagenic specificity induced by four nitro-group-containing aromatic amines in Salmonella typhimurium his gene. **Mutat. Res**.465,165-171.

CHILDS,J.J.,and CLAYSON,D.S.The metabolism of 1-phenylazo-2-naphthol in the rabbit.**Biochem.Pharmacol.**,15:1247-1258,1966.

CHUNG, K.T, STEVENS, S.E.JR. Decolorization of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. **Environ Toxicol Chem** 1993;12:2121-32.

Claxton, L. D; *Food Chem. Tox.* 43 (2005) 4-56.

CLAXTON, The development, Validation, and analysis of Salmonella mutagenicity the methods for environmental situations. In: *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques and Practice*, 1997.

Commission Decision (2003). Commission Decision 2003/460/EC of 20 June 2003 on emergency measures regarding hot chilli and hot chilli products. **Official Journal of the European Communities**, L154, 114

CONNAY, A.H.(1982) Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons:G.H.A.Clowes memorial lecture. **Cancer Research**,42,4875-4917.

D'ERRICO,A, TAIOLI,E, CHEN. X and VINEIS. P(1996) Genetic metabolic polymorphisms and the risk of cancer: a review of the literature. **Biomarkers**,1,149-173.

DEES,J,H, MASTERS, B.S.S, MULLER-EBERHARD, U and JOHNSON, E.F(1982) Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo p-dioxin and phenobarbital on the occurrence and distribution of four cytochrome P-450 isozymes in rabbit kidney, lung and liver. **Cancer Research**, 42,1423-1432.

FEDERAL REGISTRER, 1989. C.J. Disperse Blue 79:1; Testing Consent Order. Rules and Regulations.

CERNIGLIA CE, FREEMAN JP, FRANKLIN W, PACK LD. Metabolism of azo dyes derived from benzidine, 3,30-dimethyl-benzidine and 3,30-dimethoxybenzidine to potentially carcinogenic aromatic amines by intestinal bacteria. **Carcinogenesis** 1982;3:1255-60.

CHEN H. Recent advances in azo dye degrading enzyme research. **Curr Protein Pept Sci** 2006;7:101-111.

GAO Z, TSENG CH, PEI Z, BLASER MJ. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007;104:2927-32.

GIUSTI, F.; MASSONE, F.; BERTONI, L.; PELLACANI, G.; SEIDENARI, S. *Contact sensitization to disperse dyes in children*. **Pediatric Dermatology**, v 20, p 5, (2003).

GOLKA, K; KOPPS, S.; MYSLAK, Z.W; *Tox. Lett.*,151 (2004) 203-210.BRETT, A. M. OLIVEIRA; DA SILVA, L. A.; **Anal Bioanal Chem**, 373 (2002) 717-723.

GOLKA, K.; KOPPS, S.; MYSLAK, Z.W. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. **Toxicology letters**, Amsterdam, v.151, p.203-210, 2004.

GOMES-CARNEIRO, M. R., FELZENSWALD, I. & PAUMGARTTEN, F. J. R. Mutagenicity testing of (\pm)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronella, (-)-menthol and terpineol with the *Salmonella*/microsome assay. **Mutation Research**, 416: 129-136, 1998.

GONZALEZ, F.J., 2005. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. **Mutat. Res.** 569, 101–110.

GREGORY, P., 1990. Classification of the dyes by chemical structures. In: Waring, D., Hallas, G. (Eds), **The chemistry and Application of Dyes**. Plenum Press, New York.

GRIMSHAW, M.J.MASON, R.M. Bovine articular chondrocyte function in vitro depends upon oxygen tension. **Osteoarthritis Cartilage**, 2000;8:386-92.

GUARATINI, C.C.I.; FOGG, A.G. ; ZANONI, M.V.B. **Dyes and Pig.** 50 (2001) 211.

GUENGERICH, F.P.(1988a) Roles of cytochrome P450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. **Cancer Research**, 48, 2946-2954.

GUENGERICH, F.P.(1988b) Oxidation of 17-ethynylestradiol by human liver cytochrome P450. **Molecular Pharmacology**, 33, 500-508.

GUENGERICH, F.P. Comparison of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily members from different species. **Chem. Biol. Interact.**, 106: 161-182, 1997.

GUENGERICH, F.P. The 1992 Bernard B. Brodie award lecture; bioactivation and detoxication of toxic and carcinogenic chemicals, **Drug Metab. Dispos.** 21 (1993).

HARTINGER, C. H. BREHMER, T. H, GIESTER, G. GALANSKI, M. NAZAROV, A. A, LUTHERC. H, KEPPLER, B. K. 1, 1, 3, 3-Tetramethyl-1, 3-disila-2-oxa[3]ferrocenophane: improved synthesis and new crystal structure. **Inorganica Chimica Acta** 328 (2002) 237–240.

HOFFMAN, M.R.; MARTINS, S.T.; CHOI, W.; BAHNEMANN, D.W. Environmental applications of semiconductor photocatalysis. **Chemical Reviews**, v. 95, p. 69-96, 1995.

HUNGER, K. *On the toxicology and metabolism of azo dyes*. **Chimia**, v. 48, n. 11, p. 520-522, (1994).

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), Lyon, France. **História**. Disponível em: < <http://www.iarc.fr/en/research-groups/IMO/index.php>.

LANG, M.A., PELKONEN, O. (1999). Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogens In : Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer (P. Vineis, N. Malats, M.S. Lang A. d'ERRICO, N. Caporaso, J. Cuzick, P. Boffetta), **IARC**, Lyon, FR.

LEE, R.; URBAN, J.P. Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. **Biochemist. J** 1997; 321:95-102.

LIZIER, M.T. **Ocorrência de aminas aromáticas como subprodutos da degradação dos corantes Sudan III e Disperso Amarelo 9**: UNESP, 2009. 205 páginas. Dissertação (mestrado). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista " Júlio de Mesquita", Ribeirão Preto, 2009.

MARON, D.M., AMES, B N., (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mut. Res.**, 113: 173-215.

Mc LANE, K.E, FISHER, J and RAMASMUSSEN, K (1983) Reductive drug metabolism. **Drug Metabolism Reviews**, 14, 741-799.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, p. 29-60, 2000.

MURA, N.; SEKIHASHI, K.; SASAKI, Y.F. The comet assay in eight mouse organs: results with 24 azo compounds. **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 465, p. 11-26, 2000.

NELSON, S.D (1994) Covalent binding to proteins. In : **Methods in Toxicology**, Volume 1B, Academic Press, San Diego, pp. 340-348.

OLIVEIRA, D.P. **Corantes como importante classe de contaminantes ambientais – um estudo de caso**: USP, 2005. 120 páginas. Tese (doutorado). Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2005.

OHKUMA Y, HIRAKU Y, OIKAWA S, YAMASHITA N, MURATA M, KAWANISH S. Distinct mechanisms of oxidative DNA damage by two metabolites of carcinogenic o-toluidine. **Arch Biochem Biophys** 1999; 372:97-106.

OSANO O, OLADIMEJI AA, KRAAK MH, AAMIRAALI W. Teratogenic effects of amitraz, 2,4-dimethylaniline, and paraquat on developing frog (*Xenopus*) embryos. **Arch Environ Contam Toxicol** 2002; 43:42-9.

OKADA, J., KANBE. KUZUKAWA. M, IKEDA, Y, YOSHIMURA, K, HAYUAKAWA, R, MATSUNAGA, K, Contact Dermat. 25 (1991) 313. V.Cornste, Y. Govaert, G. Moens, J. V. Loco, J-M. Degroodt, J.Agric. **Food Chem.** 54 (2006) 639.

MANSUY, D., 1998. The great diversity of reactions catalysed by cytochromes P450. **Comp. Biochem. Physiol.**121C, 5–14.

MAZZETI, M., Fascioli, R., Mazzoncini, I., Spinelli, G., Morelli, I., & Bertoli, A. (2004). Determination of 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in chilli powder and in chilli-containing food products by GPC cleanup and HPLC with LC/MS confirmation, **Food Additives and Contaminants**, 21, 935–941.

NAGASE, M., OSAKI, Y., & MATSUEDA, T. (1989). Determination of methyl yellow, Sudan I and Sudan II in water by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 465, 434–437.

NELSON DR, KOYMANS L, KAMATAKY T, STEGEMAN JJ, FEYEREIS R, WAXMAN DJ, WATERMAN MR, GOTOH O, COOM MJ, ESTABROOK RW, GUNSALUS IC, NEBERT DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, 1996;6:1–42.

OTTE, P. Basic cell metabolism of articular cartilage: manometric studies. **Z Rheumatol** 1991;50:304-12.

PERERA, F.P.Environment and câncer: who are susceptible. **Science**. 1997; 278: 1068-73. PIELESK, A. BARANOWSKA, A. RYBAK, A.WLOCHOWICS, A. Detection and determination of aromatic amines as products of reductive splitting from selected azo dyes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 42}47 (2002).**Environmental Research**, Section B

PRIVAL,M.J.BELL,S.J.,MITCHELLI,V.D.,PEIRPEL,M.D.,VAUGHAN,V.L.,1984.Mutagenicity of benzidine and benzidine-congener dyes and selected monoazo dyes in a modified Salmonella assay.**Mutat.Res.**136,33-47.

PRIVALI,M.J.,MITCHELL,V.D.,1982.Analysis of a methodfor testing azo dyes for mutagenic activity in Salmonella typhimurium in the presence of flavin mononucleotide and hamster liver S9.**Mutat.Res.**97,103-116.

REIFFERSCHIED, G.; HEIL, J. Validation of the SOS / umu test using test results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. **Mutation Research**, v. 369, p.129-145, 1996.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas. Em: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas:Ulbra, 2003, p.201-223.

STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2001, 56:69–80

SPADARO, J.T, GOLD, M.H, RENGANATHAN. V. Degradation of azo dyes by the lignin-degradation fungus *Phanerochaete crysporium*. **Appl Environ Microbiol** 1992;58:2397-401.

STIBOROVÀ, M., ASFAW, B., ANZENBACHER, P., LESETICKY.L., and HODEK, P..A new way to carcinogenicity of azo dye: the benzenediazonium ion formed from non-aminoazo dye, 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene (Sudan I) by microsome enzymes binds to deoxyguanosine residues of DNA. **Cancer Lett.**, 40:327-333.1988a.

STIBOROVÀ, M., ASFAW, B., ANZENBACHER, P., LESETICKY.L., and HODEK, P. The first identification of the benzenediazonium ion formation from non-aminoazo dye, 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene(Sudan I) by microsome of rats livers. **Cancer Lett.**, 40: 319-326,1988b.

STIBOROVÁ,M.,ASFAW,B,E.,Schmeiser,H.H., and Wiessler,M.Benzenediazonium ion derived from Sudan I forms an 8-(phenylazo)guanine adduct. **Che.Res.Toxicol.**,8:489-495,1995.

STIBOROVÁ,M. MARTINEK,V.RYDLOVÁ,H.FREI,E. Sudan I is a potential carcinogen for humans: Evidence for its metabolica activation and detoxication by humana Recombinant Cytocrome P450 1A1and liver microsome. **Cancer Research** 62, 567-5684, October15,2002.

STOCKWELL,R.A. Metabolism of cartilage. In: Hall BK, editor.**Cartilage:molecular aspects**. New York: Academic Press; 1983.p.253-80.

SUDAN I.**IARC** Monographs, Vol.8,pp.225-231.Lyon, France:IARC,1975.

TEIXEIRA, J. **Química e Derivados**, São Paulo, 412, fev. (2003).

THOMPSON & THOMPSON.**Genética médica**.Editora Guanabara.1993.

TRINDER, P: Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor: **Ann Clin Biochem** 6:24, 1969.

TSUDA,S.;MATSUSAKA,N.;MADARAME,H.;UENO,S.;SUSA,N.;ISHIDA,K.;KAWA.

UMBUZEIRO,G.A e VARGAS, V.M.;Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos, p.83 em **Mutagênese Ambiental**.

XU H, HEINZE TM, CHEN S, CERNIGLIA CE, CHEN H. Anaerobic metabolism of 1-amino-2-naphthol-based azo dyes (Sudan dyes) by human intestinal microflora **Appl Environ Microbiol** 2007;73:7759–62.

WEISBURGER, J. H. Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now. **Mutation Research**, v.437, p.105–112, 1999.

WESMORLAND, CAND, D.G.The differential clastogenicity of Solvent Yellow 14 and Fd & C Yellow No. 6 in vivo in the rodent micronucleus test observation of species and tissues specificity). **Carcinogenesis(Lond)** 12; 1403- 407,1991.

WISLOCK, P.G, MIWA, G.T and LU.A.Y.T(1980) Reactions catalysed by the cytochrome P450 system. In **Enzymatic Basis of Detoxication**, Volume 1, Jakoby WB(ed.), Academic Press, New York, pp.135-182.

ZEIGER, E., ANDERSEN, B., HAWORTH, S., LAWLOR, T., and MORTELMANS, K. Salmonellamutagenicitytests.IV.Resultsfromthetestingsof300 chemicals.**Envirom.Mutagen** 12(Suppl. 11): 1-158, 1988.

ZOLLINGER,H.**Color Chemistry**:syntheses properties and applications of organic dyes and pigments.2nd ed.New York: V.C.H.Publishers,1991.496 p.

ANEXO

DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY, ANATOMY AND GENETICS
UNIVERSITY OF OXFORD

Head of Department
Professor Sir George Radda CBE FRS



Le Gros Clark Building
South Parks Road
Oxford OX1 3QX

Tel: 01865 272169
Fax: 01865 272420

Jill Urban

email: jpgu@physiol.ox.ac.uk
Tel: 01865 272509

To whom it may concern.

This is to confirm that Talitha Boldrin Zanoni spent the period January 2nd -February 13th 2009 working in my laboratory. During this time she learnt to isolate and culture primary bovine chondrocytes; metacarpalphalangeal joints were obtained from a local slaughter-house, the cartilage dissected from the joints and cells isolated by enzyme digestion. Cells were then cultured as a suspension in standard culture medium. Thalita then tested the effect of several dyes on survival and metabolism of these cells. Dyes were diluted as standard for toxicity testing, added to the cells and samples tested to examine immediate and longer term effects. Cell viability was measured as a mark of toxicity and lactate production as a mark of cell activity.

Thalita worked hard during her time in Oxford. The techniques used were all new to her but she learnt quickly and evidently has good laboratory skills as she achieved a great deal in just a few weeks. During her stay with us, Thalita completed at least 5 independent cell isolations and experiments. An initial examination of her results indicates that the dyes had a marked adverse effect on primary bovine chondrocytes, and though the results still require statistical analysis, it certainly appears that the system is promising and that experiments on primary cells would be worth following further. The technique used for isolating chondrocytes can easily be adapted for isolating other cell types such as skin fibroblasts.

Also, while she was here, Thalita presented her work to a meeting in Oxford; it was a very good presentation, very clear and interesting and provoked many questions and much discussion.

We enjoyed having Thalita working with us in the lab. She was efficient and very soon self-sufficient, she got on well with everyone and mixed well. We would be happy to have her back and to continue any collaboration which might result from her stay. We wish her well in her future career.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Urban'.

Jill Urban, PhD

APÊNDICES

APÊNDICE A - Dados brutos dos experimentos utilizando o ensaio com *Salmonella*.

TABELA 1. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperso Amarelo 9, empregando a linhagem TA1535, na ausência de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (mg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Sem S9							
0	19	14	22	19	20	18,80	2,95
2	64	108	62			78,00	26**
0,2	60	47	63			56,67	8,5**
0,02	37	34	32			34,33	2,52**
0,002	31	20	27			26,00	5,57
0,0002	15	18	10			14,33	4,04

TABELA 2. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperso Amarelo 9, empregando a linhagem TA1535, na presença de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (mg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Com S9							
0	19	20	22	19	21	20,20	1,3
2	85	76	70			77,00	4,58
0,2	75	61	67			67,67	2,08*
0,02	66	49	47			54,00	10,44*
0,002	30	27	26			27,67	7,02**
0,0002	21	24	15			20,00	4,72**

TABELA 3. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperso Amarelo 9, empregando a linhagem TA1535, na presença de ativação metabólica (S9), com estreitamento de dose.

Dose (mg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Com S9							
0	16	22	19	24	18	19,80	3,19
1,500**	102	107	114			107,67	4,16
1,000**	94	99	94			95,67	6,66**
0,5**	87	79	90			85,33	5,69**
0,1**	62	53	49			54,67	2,89**
0,001	27	21	19			22,33	6,03**

TABELA 4. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperso Amarelo 9, empregando a linhagem TA1535, na ausência de ativação metabólica (S9), com estreitamento de dose.

Dose (mg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Sem S9							
0	23	22	19	18	17	19,80	2,59
1,5**	74	92	60			75,33	16,04**
1,0**	82	77	59			72,67	12,10**
0,5**	49	38	42			43,00	5,57**
0,1*	25	22	19			22,00	6,51*
0,005	15	13	11			13,00	2,00

TABELA 5. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperso Amarelo 9, empregando a linhagem YG1042, na presença de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (mg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Com S9							
0	89	84	94	78	80	85,00	6,56
4**	272	240	200			237,33	36,07**
0,4**	120	116	132			122,67	8,33**
0,04	112	88	108			102,67	12,86
0,004	110	89	102			100,33	10,60
0,0004	89	96	93			92,67	3,51

TABELA 6. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperso Amarelo 9, empregando a linhagem YG1042, na ausência de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (mg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Sem S9							
0	88	104	80	120	96	97,60	15,39
4**	200	220	272			230,67	4,73
1*	192	160	145			165,67	41,05
0,5**	162	174	154			163,33	10,07**
0,1	128	208	152			162,67	24,01*
0,01	79	72	70			73,67	37,17**

TABELA 7. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperso Amarelo 9, empregando a linhagem YG1042, na presença de ativação metabólica (S9), com estreitamento de dose.

Dose (mg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Com S9							
0	88	104	80	120	96	97,60	15,39
4**	200	220	272			230,67	4,73
1*	192	160	145			165,67	41,05
0,5**	162	174	154			163,33	10,07**
0,1	128	208	152			162,67	24,01*
0,01	79	72	70			73,67	37,17**

TABELA 8. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperso Amarelo 9, empregando a linhagem YG1042, na ausência de ativação metabólica (S9), com estreitamento de dose.

Dose (mg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Sem S9							
0	72	64	104	96	87	84,60	16,55
4*	216	144	240			200,00	12,58
2**	168	184	168			173,33	3,06**
1**	160	144	154			152,67	12,22**
0,5**	148	152	146			148,67	3,06**
0,1	74	99	89			87,33	12,58

TABELA 9. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperso Amarelo 9, empregando a linhagem TA98, na presença de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (mg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Com S9							
0	32	26	25	26	22	26,20	3,63
3	97	56	26			59,67	2,65
0,30	36	76	40			50,67	2,52
0,03	50	30	32			37,33	11,02
0,003	20	22	25			22,33	22,03
0,0003	22	23	18			21,00	35,64

TABELA 10. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperso Amarelo 9, empregando a linhagem TA98, na ausência de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (mg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Sem S9							
0	28	30	20	19	16	22,60	6,07
3	34	34	35			34,33	0,58
0,30	22	33	32			29,00	6,00
0,03	17	19	18			18,00	1,00
0,003	13	15	19			15,67	3,06
0,0003	16	12	14			14,00	2,00

TABELA 11. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperso Amarelo 9, empregando a linhagem TA100, na presença de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (mg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Com S9							
0	104	123	99	102	115	108,60	10,06
2	135	176	136			149,00	23,39
0,20	125	166	118			136,33	25,39
0,02	114	101	106			107,00	6,56
0,002	90	86	108			94,67	11,72
0,0002	87	67	80			78,00	10,15

TABELA 12. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperso Amarelo 9, empregando a linhagem TA100, na ausência de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (mg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Sem S9							
0	111	92	106	108	90	101,40	9,69
2	115	94	117			108,67	12,74
0,20	102	103	100			101,67	1,53
0,02	105	91	92			96,00	7,81
0,002	78	101	82			87,00	12,29
0,0002	88	69	75			77,33	9,71

TABELA 13. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III em DMSO, empregando a linhagem TA98, na ausência de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (mg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Sem S9							
0	29	24	37	21	62	34,60	16,47
100	23	33	30			28,67	26**
10,0	20	22	19			20,33	8,5**
1,00	17	16	25			19,33	2,52**
0,100	14	14	20			16,00	5,57

TABELA 14. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III em DMSO, empregando a linhagem TA98, na presença de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (µg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Com S9							
0	45	47	44	49	40	45,00	3,39
100	27	28	31			28,67	2
10,0	21	21	36			26,00	9
1,00	21	24	27			24,00	3
0,100	29	21	20			23,33	6,11

TABELA 15. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III em DMSO, empregando a linhagem TA100, na ausência de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose ($\mu\text{g/placa}$)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Sem S9							
0	102	101	113	116	124	111,20	9,73
100	191	102	94			129,00	4
10,0	105	96	129			110,00	17
1,00	106	123	94			107,67	15
0,100	98	102	118			106,00	10,58

TABELA 16. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III em DMSO, empregando a linhagem TA100, na presença de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose ($\mu\text{g/placa}$)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Com S9							
0	114	124	135	124	118	123,00	7,94
500	135	132	140			135,67	8
100,0	101	132	100			111,00	18
10,00	83	98	106			95,67	12
1,000	112	128	106			115,33	11,37
0,1	120	126	144			130,00	12

TABELA 17. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III em DMSO, empregando a linhagem TA1535, na ausência de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose ($\mu\text{g/placa}$)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Sem S9							
0	8	7	11	14	13	10,60	3,05
500	13	16	12			13,67	2
100,0	12	14	8			11,33	3
10,00	18	8	8			11,33	6
1,000	13	21	9			14,33	6,11
0,1	13	9	20			14,00	6

TABELA 18. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III em DMSO, empregando a linhagem TA1535, na presença de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose ($\mu\text{g/placa}$)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Com S9							
0	12	6	7	8	10	8,60	2,41
500	14	19	13			15,33	3
100,0	10	9	13			10,67	3
10,00	10	9	13			10,67	2
1,000	10	9	13			10,67	2,65
0,1	10	9	10			9,67	1

TABELA 19. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III em DMSO, empregando a linhagem YG1042, na ausência de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (µg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Sem S9							
0	152	144	168	160	128	150,40	15,39
500	216	144	112			157,33	16
100,0	168	168	168			168,00	0
10,00	200	112	96			136,00	56
1,000	128	152	136			138,67	12,22
0,1	152	184	160			165,33	17

TABELA 20. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III em DMSO, empregando a linhagem YG1042, na presença de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (µg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Com S9							
0	168	160	176	168	200	174,40	15,39
500	192	168	176			178,67	21
100,0	184	192	120			165,33	39
10,00	160	144	160			154,67	9
1,000	152	160	96			136,00	34,80
0,1	112	144	152			136,00	21

TABELA 21. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III em DMSO+70% Álcool, empregando a linhagem TA98, na ausência de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (µg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Sem S9							
0	71	75	74	72	74	73,20	27,4
200	68	20	34			40,67	36
20,0	36	76	98			70,00	31
2,00	84	96	57			79,00	37
0,200	52	86	41			59,67	31,33

TABELA 22. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III em DMSO+70% Álcool, empregando a linhagem TA98, na presença de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (µg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Com S9							
0	25	23	27	28	34	27,40	4,16
200	40	29	38			35,67	5
20,0	28	26	38			30,67	6
2,00	25	47	39			37,00	11
0,200	27	31	36			31,33	5,86

TABELA 23. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III em DMSO+70% Álcool, empregando a linhagem TA98, na ausência de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (µg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Sem S9							
0	102	96	129	99	97	104,60	13,83
200	128	168	184			160,00	28,84
20,0	162	152	108			140,67	29
2,00	128	120	120			122,67	5
0,200	120	112	114			115,33	4

TABELA 24. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III em DMSO+70% Álcool, empregando a linhagem TA98, na presença de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (µg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Com S9							
0	144	153	155	170	205	165,40	26,49
200	207	154	172			177,67	27
20,0	175	189	176			180,00	8
2,00	198	201	199			199,33	2
0,200	217	223	187			209,00	19,29

TABELA 25. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III em DMSO+70% Álcool, empregando a linhagem TA100, na ausência de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (µg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Sem S9							
0	13	22	18	24	32	21,80	7,09
200	34	26	24			28,00	5
20,0	30	20	28			26,00	5
2,00	31	21	25			25,67	5
0,200	17	13	14			14,67	2,08

TABELA 26. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III em DMSO+70% Álcool, empregando a linhagem TA100, na presença de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (µg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Com S9							
0	23	18	35	28	33	27,40	7,02
200	63	60	69			64,00	5
20,0	27	37	48			37,33	11
2,00	25	45	37			35,67	10
0,200	23	27	35			28,33	6,11

TABELA 27. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III em DMSO+70% Álcool, empregando a linhagem TA1535, na ausência de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (µg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Sem S9							
0	13	22	18	24	32	21,80	7,09
200	34	26	24			28,00	5
20,0	30	20	28			26,00	5
2,00	31	21	25			25,67	5
0,200	17	13	14			14,67	2,08

TABELA 28. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III em DMSO+70% Álcool, empregando a linhagem TA1535, na presença de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (µg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Com S9							
0	23	18	35	28	33	27,40	7,02
0,2*	63	60	69			64,00	5
0,02	27	37	48			37,33	11
0,002	25	45	37			35,67	10
0,0002	23	27	35			28,33	6,11

TABELA 29. Avaliação da mutagenicidade do corante Disperso Amarelo 9, empregando a linhagem YG1042, na presença de ativação metabólica (S9), com estreitamento de dose.

Sudan III em DMSO TA1535+S9							
Dose (µg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Com S9							
0	12	14	6	7	8	9,40	3,44
1000	25	21	23			23,00	2**
700	21	17	22			20,00	2,65*
500,0	15	20	21			18,67	3,21*
200,00	18	13	17			16,00	2,65
100,000	15	15	13			14,33	1,15

TABELA 30. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III em DMSO+70% Álcool, empregando a linhagem YG1042, na ausência de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (µg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Sem S9							
0	162	132	107	157	98	131,20	28,73
2000	130	122	125			125,67	4,04
200	122	100	145			122,33	23
20,0	117	132	106			118,33	13
2,00	106	107	127			113,33	12
0,200	94	82	81			85,67	7,23

TABELA 31. Avaliação da mutagenicidade do corante Sudan III em DMSO+70% Álcool, empregando a linhagem YG1042, na presença de ativação metabólica (S9), em escala logarítmica.

Dose (µg/placa)	Número de Colônias por Placa					Média	DP ¹
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5		
Com S9							
0	95	126	71	86	114	98,40	21,92
2000	120	104	166			130,00	32,19
200	112	107	95			104,67	8,74
20,0	108	90	98			98,67	8,14
2,00	87	102	89			92,67	8,14
0,200	97	66	66			76,33	17,90

APÊNDICE B - Dados brutos dos experimentos com Disperso Amarelo 9 do experimento de Azul de Tripano.

TABELA 32. Avaliação da morte celular média provocada por 1 hora de incubação dos condrócitos com Disperso Amarelo 9.

Disperso Amarelo9 Dose	% Células Mortas (Média)
0	2,85
0,002	10,60
0,02	11,55
0,2	12,14
2	14,27

TABELA 33. Avaliação da morte celular média provocada por 2 horas de incubação dos condrócitos com Disperso Amarelo 9.

Disperso Amarelo 9 Dose	% de Células Mortas(Média)
0	1,15
0,002	3,33
0,02	5,48
0,2	11,40
2	26,50

TABELA 34. Avaliação da morte celular média provocada por 3 horas de incubação dos condrócitos com Disperso Amarelo 9.

Disperso Amarelo 9 Concentração	Porcentagem de Células Mortas (Média)
0	2,71
0,002	3,50
0,02	6,10
0,2	11,74
2	17,30

TABELA 35. Avaliação da morte celular média provocada por 24 horas de incubação dos condrócitos com Disperso Amarelo 9.

Disperso Amarelo 9 Concentração	Porcentagem de Células Mortas (Média)
0	8,90
0,002	10,50
0,02	18,84
0,2	30,30
2	74,00

APÊNDICE C - Dados brutos dos experimentos com Sudan III 9 do experimento de Azul de Tripano.

TABELA 36. Avaliação da morte celular média provocada por 1 hora de incubação dos condrócitos com Sudan III.

Sudan III Concentração	Porcentagem de Células Mortas (Média)
0	4,32
0,0004	11,00
0,004	14,98
0,04	18,00
4	28,27

TABELA 37. Avaliação da morte celular média provocada por 2 horas de incubação dos condrócitos com Sudan III.

Sudan III Concentração	Porcentagem de Células Mortas (Média)
0	3,22
0,0004	10,47
0,004	11,34
0,04	21,44
4	56,64

TABELA 38. Avaliação da morte celular média provocada por 3 horas de incubação dos condrócitos com Sudan III.

Sudan III Concentração	Porcentagem de Células Mortas (Média)
0	2,14
0,0004	10,93
0,004	16,12
0,04	23,20
4	61,59

TABELA 39. Avaliação da morte celular média provocada por 24 horas de incubação dos condrócitos com Sudan III.

Sudan III Concentração	Porcentagem de Células Mortas (Média)
0	1,45
0,0004	9,85
0,004	17,40
0,04	30,97
4	89,81

APÊNDICE D - Dados brutos dos experimentos com Disperso Amarelo 9 envolvendo a produção média de Ácido Lático em nM pelos condrócitos.

TABELA 40. Avaliação da produção de ácido lático média provocada por 1 hora de incubação dos condrócitos com Disperso Amarelo 9.

Disperso Amarelo 9 Concentração	Produção de Ácido Lactico (Média)
0	687,5
0,002	612,5
0,02	572,8
0,2	587,4
2	484,2
20	306,0

TABELA 41. Avaliação da produção de ácido lático média provocada por 2 horas de incubação dos condrócitos com Disperso Amarelo 9.

Disperso Amarelo 9 Concentração	Produção de Ácido Lactico (Média)
0	697,1
0,002	706,7
0,02	634,0
0,2	602,2
2	547,2
20	392,5

TABELA 42. Avaliação da produção de ácido lático média provocada por 3 horas de incubação dos condrócitos com Disperso Amarelo 9.

Disperso Amarelo 9 Concentração	Produção de Ácido Lactico (Média)
0	896,0
0,002	711,5
0,02	611,0
0,2	623,4
2	597,4
20	401,9

TABELA 43. Avaliação da produção de ácido láctico média provocada por 24 horas de incubação dos condrócitos com Disperso Amarelo 9.

Disperso Amarelo 9 Concentração	Produção de Ácido Lactico (Média)
0	916,8
0,002	927,8
0,02	811,5
0,2	788,6
2	759,2
20	595,0

APÊNDICE E - Dados brutos dos experimentos com Sudan III envolvendo a produção média de Ácido Lático em nM pelos condrócitos.

TABELA 44. Avaliação da produção de ácido láctico média provocada por 1 hora de incubação dos condrócitos com Sudan III

Sudam III Concentração	Produção de Ácido Lactico (Média)
0	500,1
0,002	493,6
0,02	498,0
0,2	493,4
2	412,5
20	402,5

TABELA 45. Avaliação da produção de ácido láctico médio provocada por 2 horas de incubação dos condrócitos com Sudan III

Sudam III Concentração	Produção de Ácido Lactico (Média)
0	680,5
0,002	620,4
0,02	647,1
0,2	645,4
2	601,0
20	427,6

TABELA 46. Avaliação da produção de ácido láctico médio provocada por 3 horas de incubação dos condrócitos com Sudan III.

Sudam III Concentração	Produção de Ácido Lactico (Média)
0	672,3
0,002	609
0,02	615,7
0,2	632,4
2	608,0
20	419,3

TABELA 47. Avaliação da produção de ácido láctico médio provocada por 24 horas de incubação dos condrócitos com Sudan III.

Sudan III Concentração	Produção de Ácido Lactico (Média)
0	989,7
0,002	687,3
0,02	674,2
0,2	670,0
2	671,8
20	618,0