

3. Materiais e métodos

3.1. Reagentes

Soro fetal bovino (SFB), meio de cultura PFMR-4 e DME (meio Eagle modificado por Dulbecco), foram adquiridos da Cultilab (São Paulo - Brasil). Ácido acético, acetonitrila, clorofórmio, acetona, etanol, ácido fórmico, metanol, cloreto de magnésio hexaidratado, dimetil sulfóxido, fosfato de potássio monobásico, cloreto de sódio, ácido fosfórico, 2'-desoxiguanosina, ditionito de sódio e sacarose foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Sulfato de ferro (II) foram adquiridos da Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia). A água foi purificada em um aparelho Milli-Q da Millipore (Bedford, USA). O indeno[1,2,3-cd]pireno, trifenileno e coroneno foram adquiridos da Supelco (Bellefonte, USA). Ácido desoxirribonucléico (DNA) de timo de bezerro, 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo), estreptomicina, penicilina, MTT (3,[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium), dicromato de sódio, anidrido acético, Tris, dimetilformamida, peroxidase de rábano tipo II, transferrina, extrato de pituitária bovina, fibronectina, insulina bovina, Fosfatase alcalina e piridina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fosfoetanolamina (P/E) e hidrocortisona foram adquiridos da Biosource (Roucheville, MD).

3.2. Equipamentos

3.2.1. Foi utilizada balança analítica da Bioprecisa (balança eletrônica), modelo FA 2104 – N Tóquio, Japão.

3.2.2. As medidas de pH foram feitas no potenciômetro da Denver Instrument Basic modelo C031603098 (Sigma);

3.2.3. Foi utilizado um agitador magnético modelo 78HW-1 Constant Temperature

Magnetic Stirrer – Biomixer para misturar as soluções;

3.2.4. Para as centrifugações foram utilizadas centrífugas refrigeradas modelos 5702R e 5804R da Eppendorf (Hamburg, Alemanha) e centrífugas sem refrigeração nos modelos Mini-Spin Plus, 5415 D da Eppendorf (Hamburg, Alemanha).

3.2.5. As incubações mantidas sob agitação foram feitas em um Orbital Incubator Shaker, Gyromax TM 703 (Amerex Instruments, Lafayette, CA) e/ou no Thermomixer 78HW-1 da Eppendorf (Hamburg, Alemanha).

3.2.6. Os espectros de absorbância foram adquiridos em um espectrofotômetro Hitachi U3000 (Tóquio, Japão).

3.2.7. Liofilizador, micromódulo E-C para secagem a baixas temperaturas, acoplado à bomba de vácuo Savant, modelo VLP200 (Hollbrook, EUA) e um concentrador modelo 5301 da Eppendorf (Hamburgo, Alemanha).

3.2.8. Para obter espectros de fluorescência foi utilizado um spectrofluorímetro Spex modelo 1681, 0,22 m Spectrometer Fluorolog (Spex Industries, Edison, NJ).

3.2.9 Para análises das amostras e separação dos produtos foi utilizado um sistema de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) da Shimadzu (Kioto, Japão). Esse sistema é constituído de duas bombas (LC-20AT) um injetor automático Proeminence (SIL-20AC), um forno para colunas (CTO-10AS/VP), um detector de arranjo de diodos modelo PDA-20AV interligados por um módulo de comunicação (CBM-20A) e o software LC-Solution.

3.2.10. As análises cromatográficas e purificação das amostras foram realizadas em um sistema de HPLC-UV/fluorescência da Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japão), constituído por duas bombas LC-10 AD, um injetor automático SIL 10AF, um detector de absorbância, modelo SPD-10 AT-VP e detector de fluorescência modelo RF10 AXL, controlados por um módulo de comunicação CBM-10A e o software Class-VP.

3.2.11. Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro Quatro II (Micromass, Manchester, U.K.) operando com fonte de ionização por spray de elétrons em modo positivo (ESI) acoplado a um sistema de HPLC da SHIMADZU (Kyoto, Japão) constituído duas bombas (Class LC-10 AD), um injetor Rheodyne (Cotati, CA), um injetor automático, modelo SIL-10 AD/VP, um forno para colunas (CTO-10AS/VP), uma válvula comutadora de fluxo (FCV-12AH) e um detector de absorvância modelo SPD-10 AV/VP controlados por um módulo de comunicação (SCL-10A/VP CBM) e os softwares (Class-VP ou CLASS LC-10AWS). As amostras foram eluídas por uma mistura de ácido fórmico (0,1% em água v/v) e acetonitrila através de coluna Luna C18 (150 mm x 2 mm) da Phenomenex, (Torrance, Ca).

3.2.12. O cultivo das células foi feito em estufa de CO₂, Instrucom da Termoforma, modelo 310 (Ohio, U.S.A.). Os sub-cultivos e procedimentos com células foram feitos em capela com fluxo laminar, VECO MM 200600 contendo filtro HEPA. Para esterilização dos meios de cultura, foram utilizados filtros 0,22 µm produzidos pela TPP (Zollicofen, Suíça).

3.2.13 Para análises microscópicas foi utilizado um microscópio invertido DM IL da Leica (Watzlar, Alemanha).

3.2.14. Foi utilizado um leitor de ELISA x 340 da Bio-tek instruments, software KC4, (Winooski, VT).

3.2.15. Para mensurar níveis de 8-oxodGuo foi utilizado um sistema de HPLC com detecção eletroquímica, constituído por uma bomba (LC-10AD, Shimadzu), um injetor Rheodyne (modelo 9125i, Cotati, CA), um detector de absorvância (SPD-10A, Shimadzu) e um detector eletroquímico Coulochem II (ESA, Chemsford, MA) controlados por um módulo de comunicação (CBM 10A, Shimadzu) e o software Class LC 10 AWS (Shimadzu).

3.2.16. Métodos:

Método I: Gradiente de água e acetonitrila (fluxo de 1 mL/min): de 0 a 60 min, 5 a 100% de acetonitrila; de 60 a 65 min, 100 a 5% de acetonitrila. A absorbância foi monitorada no intervalo de 200 a 800 nm. Para eluição das amostras, foi utilizada uma coluna analítica Luna C18(2) (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 μ m) da Phenomenex (Torrance, CA).

Método II: Gradiente de água e acetonitrila (fluxo de 1 mL/min): de 0 a 40 min, 40 a 100% de acetonitrila; de 40 a 65 min, 100% de acetonitrila; e de 65 a 75 min, 40% de acetonitrila. A absorbância foi monitorada no intervalo de 200 a 800 nm. Para eluição das amostras, foi utilizada uma coluna analítica Luna C18 (2) (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 μ m) da Phenomenex (Torrance, CA).

Método III: Gradiente de água e acetonitrila (fluxo de 1 mL/min) 0 a 5 min, 5% de acetonitrila; de 5 a 50 min, 5 a 100% de acetonitrila; até 55 min, 100% de acetonitrila; de 55 a 65 min, 100 a 5 % de acetonitrila. Condições de fluorescência para o indeno[1,2,3-*cd*]pireno (λ excitação: 335 nm; λ emissão 440 nm); coroneno (λ excitação: 350 nm; λ emissão 450 nm); e trifenileno (λ excitação: 305 nm; λ emissão: 395 nm) a absorbância foi monitorada em 254 nm. Para eluição das amostras, foi utilizada uma coluna analítica Luna C18 (2) (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 μ m) da Phenomenex (Torrance, CA).

Método IV: Gradiente de água e acetonitrila (fluxo de 1 mL/min) 0 a 5 min, 5% de acetonitrila; de 5 a 50 min, 5 a 100% de acetonitrila; até 55 min, 100% de acetonitrila; de 55 a 65 min, 100 a 5 % de acetonitrila. Para eluição das amostras, foi utilizada uma coluna analítica Luna C18(2) (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 μ m) da Phenomenex (Torrance, CA).

Método V: Gradiente de água e acetonitrila: de 0 a 15 min, 10% a 50% de acetonitrila, de 15 a 18 min, 50% de acetonitrila, de 18 a 20 min, de 50 % a 10 % de acetonitrila. As amostras foram eluídas num fluxo de 1,4 mL/min através de uma coluna Shim-Pack C 18 (150 mm x 4,6 mm i. d., 5 μ m) da Shimadzu (Kyoto, Japão).

A temperatura de forno foi mantida em 30°C. A absorvância foi monitorada em 532 nm.

Método VI: Gradiente de ácido fórmico (0,1 % em água) e acetonitrila (fluxo de 0,15 mL/min): de 0 a 40 min, 40% a 100% de acetonitrila; de 40 a 65 min, 100% de acetonitrila; e de 65 a 75 min, 40% de acetonitrila. Os fluxos de gases de secagem e nebulização (nitrogênio) foram ajustados para 400 e 10 L/h, respectivamente, o potencial capilar para 3,10 kV. A temperatura de fonte foi ajustada para 150°C. A absorvância foi monitorada no comprimento de onda de 254 nm. O software utilizado foi o MassLynx 3.2 (Micromass). Para eluição das amostras, foi utilizada uma coluna analítica Luna C18(2) (150 mm x 2 mm i.d., 3 µm) da Phenomenex (Torrance, CA).

Método VII: Gradiente de ácido fórmico (0,1% em água) e acetonitrila a um fluxo de 0,15 mL/min (de 0 a 60 min, 5 a 100% de acetonitrila; de 60 a 65 min, 100 a 5% de acetonitrila). Para eluição das amostras, foi utilizada uma coluna Luna C18 (2) (150 mm x 2 mm i.d., 3 µm) da Phenomenex Torrance, CA). Os fluxos de gases de secagem e nebulização (nitrogênio) foram ajustados para 400 e 10 L/h, respectivamente, o potencial capilar para 3,10 kV. A temperatura de fonte foi ajustada para 120°C. A absorvância foi monitorada no comprimento de onda de 254 nm. Os dados foram processados com software MassLynx 3.2 da Micromass.

Método VIII: Gradiente de ácido fórmico (0,1 % em água) e acetonitrila (fluxo de 0,15 mL/min): de 0 a 5 min, 5% de acetonitrila; de 5 a 60 min, 5 a 100% de acetonitrila; de 60 a 65 min, 100% de acetonitrila; de 65 a 75 min, de 100 a 5% de acetonitrila. Os fluxos de gases de secagem e nebulização (nitrogênio) foram ajustados para 400 e 10 L/h, respectivamente, o potencial capilar para 3,10 kV. A temperatura de fonte foi ajustada para 100°C. A absorvância foi monitorada no comprimento de onda de 254 nm. O software utilizado foi o MassLynx 3.2 (Micromass). Para eluição das amostras, foi utilizada uma coluna analítica Luna C18(2) (150 mm x 2 mm i.d., 3 µm) da Phenomenex (Torrance, CA).

Método IX: Gradiente de ácido fórmico (0,1 % em água) e acetonitrila (fluxo de 1,2 mL/min): de 0 a 5 min, 5% de acetonitrila; de 5 a 60 min, 5 a 100% de acetonitrila; de

60 a 65 min, 100% de acetonitrila; de 65 a 75 min, de 100 a 5% de acetonitrila. Os fluxos de gases de secagem e nebulização (nitrogênio) foram ajustados para 400 e 10 L/h, respectivamente, o potencial capilar para 3,10 kV. A temperatura de fonte foi ajustada para 120°C. A absorvância foi monitorada no comprimento de onda de 254 nm. O software utilizado foi o MassLynx 3.2 (Micromass). As amostras foram eluídas através de uma coluna Shim-pack C 18 (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm) da Shimadzu (Kyoto, Japão), Temperatura de forno 22°C.

3.3. Oxidação dos HPAs (indeno[1,2,3-*cd*]pireno, coroneno e trifenileno) para obtenção de produtos de oxidação (quinonas e hidroquinonas)

As massas iniciais dos HPAs foram as seguintes:

- Indeno[1,2,3-*cd*]pireno: 250 µg, (equivalente a 0,9 µmol)
- Trifenileno: 1000 µg, (equivalente a 4,38 µmol)
- Coroneno: 1000 µg, (equivalente a 3,32 µmol)

Para obtenção das quinonas utilizamos um método descrito por Cho e Harvey, 1974. Os HPAs foram dissolvidos, individualmente, em 200 µL de ácido acético/anidrido acético 1:1 a 0 °C. Em seguida foram adicionados lentamente a uma solução de dicromato de sódio (8 g, 26,7 mmol) dissolvido em 200 µL de ácido acético/anidrido acético 1:1 a 0 °C. As soluções resultantes foram incubadas sob agitação (1200 rpm), 37 °C por 24 horas, no escuro. Após esse período, foi observado um precipitado verde escuro. Foi adicionado 1 mL de água deionizada, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos, 10.000 g, 25°C (2 vezes), sendo o precipitado recuperado. Finalmente foram adicionados 1 mL de água deionizada e 1 mL de clorofórmio, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10 000 g, 25°C, a fase orgânica foi recuperada e seca (banho-maria, 50°C). O pó resultante foi ressuspenso em DMSO para ser analisado por HPLC-UV (**método II** no item **3.2.16**) e HPLC/ESI/MS (**método VI** no item **3.2.16**). Para controle, os HPAs foram submetidos às mesmas condições de incubação, com exceção do dicromato de sódio.

Para obtenção de hidroquinonas, as misturas de quinonas dos HPAs (indeno[1,2,3-*cd*]pireno, trifenileno e coroneno) obtidas conforme descrito acima, foram dissolvidas em 500 µL de dimetilformamida e em seguida foi adicionado 1 mg de NaBH₄. As soluções foram mantidas em incubação por 1 h, 37°C sob agitação (1200 rpm), no escuro. Após a incubação, o nitrogênio líquido foi borbulhado na amostra por 10 minutos para remover oxigênio molecular da mistura. Em seguida foi adicionado éter (também borbulhado com nitrogênio) e as amostras foram centrifugadas por 5 min a 200 g, 25°C, para remover resíduos de hidreto de sódio. A mistura (sobrenadante) foi alíquotada e seca em fluxo de nitrogênio.

Para obtenção de hidroquinonas acetiladas estáveis (Cho e Harvey, 1975), as misturas de quinonas obtidas conforme descrito acima, foram dissolvidas em 200 µL de dimetilformamida e em seguida foi adicionado 1 mg de NaBH₄. A solução resultante foi mantida sob agitação (1200 rpm) a 37°C por 1 hora, no escuro. Após esse período foram adicionados 20 µL de piridina e 180 µL de anidrido acético e as amostras foram novamente incubadas por 5 horas, a 37°C, sob agitação (1200 rpm). Decorrido esse período, foram adicionados às soluções 500 µL de água deionizada. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos, 10 000 g (2 vezes), descartando o sobrenadante. Em seguida foram adicionados 1 mL de água deionizada e 1 mL de clorofórmio e novamente centrifugadas (10000 g, 5 minutos, 25°C). A fase orgânica foi recuperada e seca a 50°C (banho-maria). O pó resultante foi ressuspensão em DMSO para análise. Para controle, as quinonas foram submetidas às mesmas condições de incubação, com exceção do NaBH₄.

As amostras foram analisadas por HPLC-UV (**ver método II** no item **3.2.15**) e HPLC/ESI/MS (**método VI** no item **3.2.16**).

3.4. Investigação da formação de adutos

3.4.1. Incubações de indeno[1,2,3-*cd*]pireno com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e 2'-desoxiguanosina (dGuo)

Foram feitas incubações com diferentes concentrações de indeno[1,2,3-

cd]pireno e peróxido de hidrogênio:

Incubação I

600 µg de dGuo (pH 11)

2,2 mM H₂O₂

0,4 mM de indeno[1,2,3-*cd*]pireno

Tampão carbonato 50 mM (pH 11) qsp 600 µL

Foram realizadas incubações controles (sem dGuo e sem HPA) nas mesmas condições da amostra.

Incubação II

600 µg de dGuo (pH 11)

3,66 mM de H₂O₂

1,67 mM de indeno[1,2,3-*cd*]pireno

Tampão carbonato 50 mM (pH 11) qsp 600 µL.

Foram realizadas incubações controles (sem dGuo e sem HPA) nas mesmas condições da amostra.

A solução estoque do indeno[1,2,3-*cd*]pireno foi preparada em acetona/acetonitrila 2:1. Nos controles (sem a presença do HPA) foram adicionados os volumes de acetonitrila e acetona equivalentes aos adicionados às amostras.

O nucleosídeo (dGuo) foi dissolvido em 300 µL de tampão carbonato 50 mM (pH 11). As amostras foram incubadas sob agitação (1200 rpm), 37 °C por 24 horas. Após esse período, os produtos constituintes das amostras foram analisados por HPLC/UV, (ver descrição do **método I**, no item **3.2.16**) e em seguida analisados por HPLC/ESI/MS (**método VII** do item **3.2.16**).

3.4.2. Incubação dos HPAs (indeno[1,2,3-*cd*]pireno, coroneno e trifenileno) e seus produtos de oxidação (quinonas e hidroquinonas acetiladas) com dGuo

Os produtos de oxidação dos HPAs (indeno[1,2,3-*c,d*]pireno, coroneno e trifenileno) foram obtidos conforme método descrito no item **3.3**. Para cada incubação (0,9 μmol de indeno[1,2,3-*cd*]pireno, 8 μmol de coroneno e 4,38 μmol de trifenileno e quantidades correspondentes de seus produtos de oxidação):

- HPA, quinona ou hidroquinona acetiladas em 300 μL acetonitrila/acetona 2:1
- 600 μg de dGuo
- Tampão carbonato 50 mM (pH 11) qsp 600 μL

As amostras foram incubadas por uma noite, sob agitação (1200 rpm) a 37°C. No dia seguinte, foram liofilizadas e ressuspensas em 300 μL de água deionizada e 100 μL de acetonitrila para análise por HPLC/ESI/MS (ver **método VII**, item **3.2.16**).

3.4.3. Incubação do trifenileno, indeno[1,2,3-*cd*]pireno e coroneno e seus respectivos produtos de oxidação (quinonas e hidroquinonas acetiladas) com dGuo na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Em 200 μL de solução de dGuo (2 mM) em tampão carbonato/bicarbonato (pH 11, 50 mM) foram adicionados 150 μL das soluções de HPAs ou de seus produtos de oxidação (quinonas ou hidroquinonas acetiladas) na concentração de 360 μM em acetonitrila. Em seguida foram adicionados 164 μL de peróxido de hidrogênio e a solução resultante foi avolumada para 764 μL com acetonitrila. Os produtos de oxidação foram obtidos conforme método descrito no item **3.3**. Concentração final dos reagentes:

523 μM de dGuo

1870 μM de H_2O_2

70,7 μM do HPA (coroneno, trifenileno ou indeno[1,2,3-*cd*]pireno) ou produtos de oxidação

Foram realizadas incubações controles (sem HPA e sem dGuo) nas mesmas condições. Amostras e controles foram mantidos por 24 h a 50°C, sob

agitação (1200 rpm), protegidos da luz.

Após término do período de incubação, as amostras e controles foram liofilizados e ressuspensos em 300 µL de acetonitrila/água 1:2, para análise em HPLC-PDA conforme descrito no item **3.2.16, método IX**. Os picos incomuns aos controles foram purificados e analisados pelo HPLC-ESI/MS/MS como descrito no item **3.2.16, método VII**

3.4.4. Incubação do trifenileno, indeno[1,2,3-*cd*]pireno, coroneno ou seus respectivos produtos de oxidação (quinonas ou hidroquinonas acetiladas) com dGuo na presença de THF (tetrahidrofurano) oxidado

Os produtos de oxidação dos HPAs foram obtidos conforme método descrito no item **3.3**.

Para cada HPA foram realizadas incubações individuais:

- 500 µg do HPA, quinonas ou hidroquinonas acetiladas em 500 µL de THF oxidado
- 1500 µg de dGuo em 500 µL de tampão Tris-HCl 1 mM, pH 7,0

Foram realizadas incubações controles (sem dGuo ou sem HPA/produtos de oxidação) nas mesmas condições da amostra.

Amostras e controles foram incubados a 50 °C, por uma noite, sob agitação (1200 rpm). Após o período de incubação, foi feita extração com igual volume de clorofórmio, (centrifugado 300 g, 5 min, temperatura ambiente). A fase aquosa foi analisada por HPLC/ESI/MSMS (ver descrição do item **3.2.16, método VII**). Para detecção de adutos, foi utilizada a função de MRM do espectrômetro de massa para monitorar fragmentação de íons pais (massa/carga (m/z) 512) para os íons filhos correspondentes (m/z 395). Para obtenção dos espectros em MS_1 com diferentes voltagens de cone, foi utilizado o intervalo de relação m/z de 100 a 600 Da. Para os espectros de MS_2 foi utilizada uma voltagem de cone de 40 V, pressão de gás na célula de colisão $1,3 \times 10^{-3}$ mbar e energia de colisão em 15 eV.

3.4.5. Incubação dos HPAs (indeno[1,2,3-cd]pireno, coroneno ou trifenileno) ou seus produtos de oxidação (quinonas e hidroquinonas acetiladas) com microsossomos de fígado de ratos submetidos a diferentes indutores enzimáticos

3.4.5.1. Indução enzimática por aroclor, fenobarbital e 3-metilcolantreno para obtenção de fração microsossomal

Para obtenção dos microsossomos foram utilizados ratos Sprague-Dawley machos (231g de massa corpórea - peso médio) que foram submetidos a indução enzimática conforme descrição a seguir:

- ✓ Aroclor 35 mg/Kg por 5 dias consecutivos (total de 2 ratos);
- ✓ 3-Metilcolantreno 20 mg/Kg por 3 dias consecutivos (4 ratos);
- ✓ Fenobarbital 32 mg/0,460 Kg de massa corpórea por 3 dias consecutivos

Os indutores foram administrados por injeção intra-peritoneal. No dia seguinte à última dose, os ratos foram sacrificados por decapitação e os fígados foram removidos, lavados com NaCl 0,9% e congelados a -80°C .

3.4.5.2. Extração dos microsossomos de fígado dos ratos

A fração microsossomal foi obtida por homogeneização do fígado do rato Sprague-Dawley (como descrito no **item 3.4.5.1.**) em tampão fosfato de potássio 0,1 M / EDTA 5 mM (pH 7,4). Os homogenatos foram centrifugados a 16 900 g por 15 min a 4°C , os precipitados foram descartados e os sobrenadantes foram centrifugados a 105 000 g por 95 min. Os precipitados foram, então, recuperados e ressuspensos em tampão fosfato de potássio 0,1 M / EDTA 5 mM (pH 7,4). Novamente as amostras foram centrifugadas a 105 000 g por 90 min, os

sobrenadantes descartados e os precipitados ressuspensos em tampão fosfato de potássio 0,1 M / EDTA 5 mM (pH 7,4), obtendo-se pools com diferentes atividades enzimáticas, que foram aliquotados e armazenados a -80°C .

3.4.5.3. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteína microsomal foi feita utilizando-se o método de Bradford, conforme descrição a seguir:

Soluções:

Solução de dosagem:

5 mg de azul brilhante de Coomassie G-250

2,5 mL de etanol 95%

5 mL de ácido fosfórico 85%

50 mL qsp água deionizada

Solução A: NaCl 0,15 M

O método se baseia na observação de que o azul brilhante de Coomassie G-250 gera um cromóforo azul após ligação à proteína. O complexo é formado rapidamente (2 minutos), permanece disperso em solução por um tempo relativamente longo (1 hora) e tem um alto coeficiente de extinção molar, o que permite grande sensibilidade na dosagem das proteínas (BRADFORD, 1976).

A curva padrão para dosagem de proteínas foi construída utilizando-se albumina de soro bovino (10-100 μg de albumina em 100 μL de solução). As soluções de proteínas foram preparadas na solução A. Aos tubos contendo 100 μL de solução de proteínas foram adicionados 5 mL de solução para dosagem. Após agitação, foi verificada a absorbância em 595 nm, usando cubetas de 3 mL contra um branco contendo 100 μL da solução A e 5 mL da solução para dosagem. A massa de proteínas foi então plotada contra absorbância correspondente, resultando na curva padrão para determinação do conteúdo de proteína nas amostras.

Para dosagem de proteínas nas amostras, frações de microsomos (20 μL)

foram adicionadas a 80 μ L de solução A. As soluções resultantes foram adicionadas a 5 mL da solução de dosagem e a leitura da absorbância feita como descrito acima.

3.4.5.4. Quantificação de Citocromo P450 nas amostras de microsomas de fígado de ratos

As proteínas microsomais foram diluídas (0,66 mg/mL) em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) e em seguida foram adicionados 20 mg de ditonito de sódio. A amostra foi saturada com CO (monóxido de carbono) (~ 1 min) e 30 minutos após a saturação, foi feita a leitura de absorbância no intervalo de 380 a 650 nm. Paralelamente foi feita a leitura do branco (amostra sem CO) e o cálculo da concentração de CYP450 foi feito a partir da intensidade da absorbância diferencial em 450 nm entre a amostra completa e o branco ($\epsilon = 91 \text{ mM cm}^{-1}$).

3.4.5.5. Incubações de HPAs (indeno[1,2,3-*cd*]pireno, coroneno ou trifenileno) ou seus produtos de oxidação (quinonas e hidroquinonas acetiladas) com dGuo e microsomas

Os microsomas de fígado de ratos Sprague-Dawley foram obtidos como descrito no item **3.4.5.2**. Foram feitas incubações individuais com microsomas induzidos por aroclor, fenobarbital ou 3-metilcolantreno para cada HPA (0,445 mM de indeno[1,2,3-*cd*]pireno, 2,19 e 30 mM de trifenileno e 1,66 e 30 mM de coroneno). Cada amostra continha:

- Indeno[1,2,3-*cd*]pireno ou coroneno ou trifenileno ou produtos de oxidação de cada HPA (quinonas ou hidroquinonas acetiladas) nas concentrações descritas acima.
- 2 mg de microsomas
- 8 mM glicose-6-fosfato

- 5 mM cloreto de magnésio
- 1,5 U de glicose 6-fosfato-desidrogenase
- 0,6 mM NADP
- 3 M de dGuo
- Tampão fosfato de sódio 50 mM, KCl 150 mM, num volume final de 2 mL.

Controles (sem HPA ou sem dGuo) com os mesmos reagentes em igual concentração foram incubados nas mesmas condições da amostra: 37°C, sob agitação (1200 rpm), no escuro, por uma noite.

Foram realizadas incubações com pré-ativação metabólica do trifenileno ou de seus produtos de oxidação (quinonas ou hidroquinonas acetiladas) e microsomas induzidos por diferentes substâncias (aroclor, 3-metilcolantreno ou fenobarbital) e em seguida foi adicionado dGuo conforme descrito a seguir.

Amostra:

- 2 mg de microsomas (indução por aroclor ou fenobarbital ou 3-metilcolantreno)
- 8 mM glicose-6-fosfato
- 5 mM cloreto de magnésio
- 0,6 mM NADP
- 1,5 U glicose 6-fosfato-desidrogenase
- 2,19 mM de trifenileno, quinonas ou hidroquinonas acetiladas
- Tampão fosfato de sódio 50 mM, KCl 150 mM, qsp 2 mL

A amostra contendo microsomas, glicose-6-fosfato, cloreto de magnésio, NADP, glicose 6-fosfato-desidrogenase e tampão fosfato de sódio 50 mM/KCl 150 mM foi incubada por 30 min, 37°C, sob agitação. Na seqüência, foi adicionado o trifenileno ou seus produtos de oxidação (quinonas ou hidroquinonas acetiladas) e feita incubação por mais 10 min, 37°C, sob agitação (1200 rpm) no escuro. Após esse tempo, foi acrescida dGuo e feita incubação por 16 h, 37°C, no escuro, sob agitação (1200 rpm).

Amostras e controles (sem dGuo e sem HPA ou produtos de oxidação)

foram submetidos às mesmas condições de incubação descrita acima.

Após as incubações descritas acima, foi feita extração com igual volume de acetato de etila (900 g, 5 min, 25 °C). A fase orgânica foi removida e seca, armazenada a -20 °C. Foi ressuspensa em DMSO para análise por HPLC-UV (item **3.2.16, método IV**) e HPLC-ESI/MS (ver descrição no item **3.2.16, método VIII**). À fase aquosa foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio, para nova extração (10000 g, 5 min, 25 °C). A fase aquosa foi recuperada e armazenada a -20 °C até a análise por HPLC/PDA (item **3.2.16, método IV**) e HPLC-ESI/MS (item **3.2.16, método VIII**).

3.4.6. Investigação da formação de adutos DNA-HPA via Peroxidase

3.4.6.1. Incubações de DNA com HPAs (indeno[1,2,3-*cd*]pireno, coroneno ou trifenileno) ou seus produtos de oxidação (quinonas ou hidroquinonas) na presença de HRP/H₂O₂

Uma mistura de 0,2 mg de HRP (Peroxidase de Rábano tipo II), 2 mg de DNA de timo de bezerro, 0,5 mM de H₂O₂, 200 µM de HPA (indeno[1,2,3-*cd*]pireno, coroneno ou trifenileno) ou seus produtos de oxidação, foi feita em 1 mL de tampão fosfato de sódio 67 mM (pH 7,0).

As amostras e controles (sem HPAs ou produtos de oxidação) foram incubados por 120 minutos, 37 °C, sob agitação, no escuro.

Após a incubação, o DNA foi precipitado como descrito abaixo.

3.4.6.2. Precipitação do DNA

Para cada 500 µL de amostra foram adicionados 100 µL de tampão acetato 3M (pH 5,2) e 500 µL de isopropanol, seguido por centrifugação a 5 000 g,

15 min, 4 °C. O pellet foi recuperado e o DNA foi lavado 2 vezes com 500 µL de etanol 70%, (5 000 g 15 min) para remover os HPAs livres na amostra, prevenindo interferência dos mesmos no momento da análise. Em seguida o DNA foi ressuspenso em 500 µL de água deionizada.

A concentração do DNA das amostras foi determinada por leitura da absorbância em 260nm ($C = Abs(260\text{ nm}) \times 50 \times \text{fator de diluição}$). Foram feitas análises dos produtos fluorescentes por espectrofluorímetro (ver descrição no item **3.2.9**), por HPLC/UV/fluorescência (**método III** descrito no item **3.2.16**) e HPLC/ESI/MS (item **3.2.16**, **método VIII**).

3.4.6.3. Análise espectrofluorimétrica do DNA

Para análise da fluorescência, as amostras de DNA incubadas conforme descrito no item **3.4.6.1**. Foram diluídas 30 x em tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 7,0). Os espectros de fluorescência (emissão) foram obtidos fixando-se um comprimento de onda de excitação para cada HPA (Coroneno $\lambda_{exc} = 350\text{ nm}$; Indeno[1,2,3-*cd*]pireno e $\lambda_{exc} = 335\text{ nm}$; trifenileno $\lambda_{exc} = 305\text{ nm}$), comparou-se os espectros do DNA de cada incubação, do DNA controle e dos HPAs individualmente.

3.4.6.4. Hidrólise enzimática do DNA

Para análise no HPLC, o DNA foi hidrolisado enzimaticamente como descrito a seguir: 100 µg de DNA foi dissolvido em tampão Tris-HCl 0,2 M (10 µL, pH 7,4) e NgCl_2 2 M (10 µL) e em seguida foi adicionado DNase 1 (1,25 unidades) e a amostra foi incubada por a 37 °C por 1,5 hora. Foram adicionados 10 µL de glicina-acetato 0,2 M (pH 10) e 0,008 de fosfodiesterase 1 (PDE1) e feita nova incubação a 37 °C por 1,5 hora. Finalmente foram adicionados 25 µL de tampão Tris-HCl- MgCl_2 0,2 M (pH 7,4) e 3 unidades de fosfatase alcalina. A amostra foi incubada a 37°C por 1 hora. Após hidrólise, feito extração com clorofórmio 1:1 de amostra (v/v), e feito

centrifugado (300 g, 5 min). Após obtenção da fase polar, o volume final da solução foi ajustado para 200 µL com água deionizada.

3.4.6.5. Análise por HPLC/UV/fluorescência e HPLC/ESI/MS

Após hidrólise do DNA (item **3.4.6.4**), as amostras foram analisadas e purificadas por HPLC/UV/Fluorescência utilizando o **método III**, conforme descrito no item **3.2.15**. Os volumes correspondentes aos picos coletados foram liofilizados e ressuspensos em 200 µL de água deionizada para análise no HPLC/ESI/MS conforme descrito no item **3.2.16. método VIII**.

3.5 Citotoxicidade e Genotoxicidade em células HepG2 e THLE-2 incubadas com indeno[1,2,3-*cd*]pireno, coroneno, trifenileno e seus produtos de oxidação (quinonas e hidroquinonas acetiladas)

3.5.1 Cultivo e expansão celular

Soluções:

PBS: 137 mM NaCl, 1,68 mM de KCl, 1,47 mM de Na₂HPO₄. pH 7. Solução autoclavada.

Tripsina: 0,1% (p/v) de tripsina em PBS contendo 1mM de EDTA pH 7,0. Solução previamente esterilizada através de filtro de membrana 0,22 µm.

Meios de Cultura:

Os meios de cultura foram esterilizados através de filtro de membrana 0,22 µm e em seguida foram adicionados suplementos. O SFB estéril foi adicionado ao meio de cultura estéril de acordo com a necessidade do uso.

a) Meio de cultura PFMR-4 suplementado com 2 mM de L-glutamina, 50

µg/mL de gentamicina, 1,75 µM insulina, 0,2 µM hidrocortisona, 5 ng/mL fator de crescimento epidérmico (EGF), 10 µg/mL de transferrina, 50 nM fosfoetanolamina (P/E), 50 nM de triiodotironina (T3), 7,5 µg/mL de extrato de pituitária bovina, 0,33 nM ácido retinóico e 10% de soro fetal bovino (SFB).

b) meio Eagle Modificado por Dulbecco (DME), suplementado com 10 mg/L de penicilina, 10 mg/L de sulfato de estreptomicina e 1,2 g/L NaHCO₃.

c) meio indutor de CYP450: solução balanceada de Earle suplementada com 1U/L de insulina bovina, 0,1 mM hidrocortisona, 0,1 mM ácido-δ-aminolevulínico e 10 % de SFB.

Células de carcinoma hepatocelular humano (linhagem HepG2) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DME), suplementado como descrito no item **3.5.1.b.** e incubadas em atmosfera de CO₂/ar (1:19) a 37°C. Os sub-cultivos foram realizados a cada 4 dia até obter quantidade de células suficiente para os ensaios.

Células com características de hepatócitos primários (Linhagem THLE-2), foram cultivadas em meio de cultura PFMR-4 suplementado como descrito no item **3.5.1.a.** Elas cresceram em garrafas plásticas, aderidas sobre um filme de colágeno, recomendado pela ATCC, composto por 0,01 mg/mL de fibronectina, 0,01 mg/mL de albumina e 0,03 mg/mL de colágeno tipo I. O filme foi preparado no meio PFMR-4 (item **3.5.1.a.**) e requer solidificação prévia (mínimo de 2 horas) em estufa com temperatura constante a 37°C. Os sub-cultivos foram realizados a cada 3-5 dias, após confluência celular. A troca do meio de cultura suplementado com 10% de SFB foi realizada a cada 3-5 dias. Essas células apresentam características de hepatócitos primários e imortalidade adquirida após transfeção do antígeno T do simian vírus 40 (SV40) (MACÉ *et al.*, 1997).

Repique das células: após a retirada do meio, a cultura foi lavada 2 vezes com PBS. A seguir foi incubada a 37°C com volume mínimo de tripsina (1,5 mL) de solução de tripsina (para as células THLE-2, a solução de tripsina utilizada foi diluída 2 vezes com PBS) até que as células se desprendessem (± 2 min). As células foram então ressuspensas nos seus respectivos meios de cultura e a suspensão foi distribuída para novas garrafas ou placas.

Todos os procedimentos com as células foram realizados em fluxo laminar, com esterilização prévia do ambiente com radiação UV (ultravioleta) por 15

minutos.

3.5.2 Determinação da viabilidade celular pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)

Soluções:

Solução de lise: 100% de DMSO

MTT: 5 mg/mL em PBS

O método originalmente descrito por Mosmann (1983), se baseia na conversão do sal de tetrazólio (MTT) para o produto colorido formazan, cuja concentração pode ser determinada espectrofotometricamente. Essa conversão ocorre principalmente em mitocôndrias intactas e, portanto, células viáveis (HANSEN *et al.*, 1989).

As células foram semeadas numa densidade de 1×10^5 células/poço em placas de 96 poços. No dia seguinte foram feitas incubações com as substâncias de interesse, em quadruplicata para cada amostra, por 16 horas a 37°C em meio de cultura suplementado com SFB.

Ao final de cada incubação, o meio de cultura foi substituído por outro sem soro, e foram adicionados 20 μ L de solução de MTT. Após 2 horas de incubação a 37°C, o meio contendo MTT foi removido com cuidado para não aspirar o formazan precipitado do poço. Foram então adicionados 200 μ L da solução de lise (DMSO 100%). Após solubilização do precipitado, foi feita leitura da absorbância a 570 nm, no leitor de ELISA. Os resultados foram expressos em porcentagem de sobrevivência relativa ao grupo controle.

Para cada determinação, um grupo de células foi incubado com 20% de DMSO para servir de controle positivo do ensaio.

3.5.3. Incubação de células (linhagem THLE-2) com indeno[1,2,3-c,d]pireno, coroneno, trifenileno e seus produtos de oxidação (quinonas e hidroquinonas acetiladas) para determinação da viabilidade celular

O filme de colágeno foi preparado como descrito no item **3.5.1.** e foram adicionados 20 µL/poço (em placa de 96 poços). Foi feita incubação a 37°C por 2 horas para solidificação.

Em seguida, células THLE-2 foram semeadas na densidade de 1×10^5 células/poço (placas de 96 poços), em meio de cultura PFMR-4, suplementado como descrito no item **3.5.1a** e incubadas por 24 horas a 37°C. Após esse período, foi feita exposição a diferentes concentrações de indeno[1,2,3-cd]pireno (20, 50, 100 e 200 µM), coroneno (20, 50, 100 e 200 µM), trifenileno (20, 50, 100 e 200 µM) ou seus produtos de oxidação (quinonas ou hidroquinonas acetiladas) (20, 50, 100 e 200 µM), em quadruplicata, por 16 horas. O ensaio de viabilidade celular foi feito como descrito no item **3.5.2.**

3.5.4. Incubação de células (linhagem HepG2) com indeno[1,2,3-cd]pireno, coroneno, trifenileno e seus produtos de oxidação (quinonas e hidroquinonas acetiladas) para determinação da viabilidade celular

As células HepG2 foram semeadas na densidade de 1×10^5 células/poço em placas de 96 poços, em meio de cultura DME suplementado como descrito no item **3.5.1 b.**, incubadas por 24 horas a 37°C.

Após esse período, as células foram expostas por 16 horas às substâncias em estudo (indeno[1,2,3-cd]pireno (20, 50 e 80 µM), coroneno (20, 50 e 100 µM) ou trifenileno (10, 20, 50 e 100 µM) ou seus produtos de oxidação (quinonas e hidroquinonas acetiladas), em quadruplicata, por 16 horas. O ensaio de viabilidade celular foi feito como descrito no item **3.5.2.**

3.5.5. Incubação de células (linhagem HepG2 em filme de colágeno) com indeno[1,2,3-*cd*]pireno, coroneno, trifenileno e seus produtos de oxidação (quinonas e hidroquinonas acetiladas) para determinação da viabilidade celular

O filme de colágeno foi preparado como descrito no item **3.5.1.** e foram adicionados 20 µL/poço (em placa de 96 poços). Foi feita incubação a 37°C por 2 horas para solidificação.

Em seguida, células HepG2 foram semeadas na densidade de 1×10^5 células/poço em placas de 96 poços, em meio de cultura DME suplementado como descrito no item **3.5.1b**, incubadas por 24 horas a 37°C. Após esse período, foram feitas as exposições ao indeno[1,2,3-*cd*]pireno (20, 50, 100 e 200 µM), coroneno (20, 50, 100 e 200 µM), trifenileno (20, 50, 100 e 200 µM) ou seus produtos de oxidação (quinonas ou hidroquinonas acetiladas), em quadruplicata, por 16 horas. O ensaio de viabilidade celular foi feito como descrito no item **3.5.2.**

3.5.6. Incubação de células (linhagem HepG2 cultivadas em meio Earle) com indeno[1,2,3-*cd*]pireno, coroneno, trifenileno e seus produtos de oxidação (quinonas e hidroquinonas acetiladas) para determinação da viabilidade celular

A expansão celular foi feita em meio DME conforme descrito no item **3.5.1.b.** até quantidade suficiente para o ensaio. Na seqüência, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado um meio de cultura indutor de CYP450 (solução balanceada de Earle modificada como descrito por DOOSTDAR *et al.*, 1988) e incubadas a 37 °C, 5 % CO₂ por 7 dias consecutivos. No sétimo dia, as células HepG2 foram semeadas numa densidade de 1×10^5 células/poço (placas de 96 poços), incubadas por mais 24 horas a 37°C em solução balanceada de Earle, como descrito acima. Após esse período, foi feita exposição ao indeno[1,2,3-*cd*]pireno (20, 50, 100 e 200 µM), coroneno (20, 50, 100 e 200 µM), trifenileno (20, 50, 100 e 200

μM) ou seus produtos de oxidação (quinonas e hidroquinonas acetiladas) em quadruplicata, por 16 horas. O ensaio de viabilidade celular foi feito como descrito no item 3.5.2..

3.5.7. Incubações para extração de DNA e determinação de dano oxidativo (8-oxodGuo)

Células HepG2 cultivadas em meio DME suplementado como descrito no item 3.5.1.b., em placas de 15 cm de diâmetro (aproximadamente 3×10^7 células por placa) foram incubadas com indeno[1,2,3-*cd*]pireno (50 μM), coroneno (20 μM), trifenileno (10 μM), ou seus produtos de oxidação (quinonas ou hidroquinonas acetiladas nas mesmas concentrações dos seus respectivos HPAs) em triplicata, em 15 mL de meio de cultura com 10 % SFB, por 16 horas, a 37°C, na estufa de CO₂. Em seguida as células foram removidas das placas e o DNA foi extraído como descrito abaixo.

Paralelamente foi extraído DNA de células incubadas com volume de DMSO (grupo controle) equivalente às amostras.

Em seguida feita a extração do DNA.

3.5.8. Extração de DNA

Soluções

Tampão A: 320 mM de sacarose; 5 mM MgCl₂; 1 % de triton X-100; 10 mM Tris HCl; 0.1 mM de desferroxamina) pH 7.5.

Tampão B: 10 mM Tris HCl, 5 mM EDTA Na₂, 0,15 de desferroxamina, pH 7,4.

Tampão C: 10 mM de Tris-HCl; 1 mM de EDTA; 2,5 mM de desferroxamina, pH 7,4.

Solução de NAI: 7,6 M de NaI; 40 mM de Tris-HCl; 20 mM de EDTA. Na₂. pH 8.

Para extração do DNA, as células de cada placa foram homogeneizadas com 5 mL de tampão A e centrifugadas a 1500 g por 10 minutos, 4°C. Foram

descartados os sobrenadantes e os precipitados foram ressuspensos em 5 mL de tampão A e centrifugados a 1500 g, 10 minutos, 4°C. A seguir, adicionou-se em cada tubo 4 mL de tampão B e 233 µL SDS (10 %), agitou-se, e adicionou-se as enzimas: 0,4 µL de RNase T1 (20 U/µL em tampão C) e 3 µL de RNase A (10 mg/mL em tampão C). As amostras foram incubadas por 1 h, 37 °C. Após este tempo, foram adicionados 30 µL de proteinase K (20 mg/mL) e as amostras foram incubadas por mais 1 h a 37 °C. Após a segunda incubação, as amostras foram centrifugadas a 5000 g, 15 minutos, 4 °C. Foi descartado o precipitado e ao sobrenadante foram adicionados 2 mL de NAI e 5 mL de isopropanol. Após leve agitação para precipitar o DNA, as amostras foram armazenadas a -20 °C, por 1 dia. No dia seguinte, após visualização do DNA precipitado, foi feita centrifugação a 5000 g, 4°C por 15 min e descartado o sobrenadante. Ao tubo contendo o DNA, foram adicionados 5 mL isopropanol 60% (isopropanol:água v/v), feita centrifugação a 5000 g, 15 min, 4°C, descartado o sobrenadante e ao precipitado foram adicionados 10 mL de etanol 70% (etanol:água v/v) e novamente feito centrifugação 5000 g, 15 min, 4°C. O pellet formado foi ressuspenso em 500 µL de desferroxamina 0,1 mM e armazenado a -20°C até o momento da análise.

3.5.9. Análise de 8-oxodGuo por HPLC com detecção eletroquímica

As amostras de DNA hidrolisadas enzimaticamente (ver descrição no item **3.4.5.4.** de materiais e métodos) foram analisadas por um sistema de HPLC com detecção eletroquímica (descrito no item **3.2.15** de materiais e métodos).

Os potenciais dos eletrodos 1 e 2 do detector eletroquímico foram fixados em +130 mV e +280 mV para detecção de 8-oxodGuo. A eluição da amostra foi feita através de uma coluna luna C18 (2) (250 mm x 4,6 mm id., 5 µm, Phenomenex) com fase móvel constituída por 8% de metanol em tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 5,5) a um fluxo de 0,8 mL/min, com controle contínuo de temperatura em 16°C. Nessas condições o tempo de retenção de 8-oxodGuo foi de aproximadamente 25 min.

A eluição dos nucleosídeos não modificados foi monitorada

simultaneamente por absorvância a 254 nm. As áreas correspondentes aos picos de 8-oxodGuo e deoxiguanosina (dGuo) foram quantificadas e plotadas em curvas padrões de 8-oxodGuo e de dGuo para obtenção da fração molar 8-oxodGuo/dGuo presente em cada amostra de DNA.

O método requer atenção especial no sentido de eliminar artefatos durante a manipulação do DNA, que interfiram nos níveis de 8-oxodGuo mensurados. Entre os cuidados estão incluídos: método de extração do DNA, redução do tempo entre extração do DNA e análise, controle de temperatura durante a manipulação (manter amostras no gelo durante o processo) e armazenamento das amostras (-20°C), otimização do processo de hidrólise enzimática, limpeza do injetor, quantidade de DNA analisada (acima de 40 µg) (LUNEC *et al.*, 2002).

Todos os solventes utilizados foram filtrados e desgaseificados.

3.5.10. Incubações para determinação da peroxidação lipídica

Células HepG2 foram cultivadas como descrito no item **3.5.1.** até quantidade suficiente para o ensaio. Após expansão celular em placas de 150 mm de diâmetro, e crescimento até 90% de confluência (aproximadamente 3×10^7), o meio de cultura foi substituído por meio DME sem vermelho fenol (fenol red), contendo 10% de SFB. Em seguida, foi feita incubação das células com indeno[1,2,3-*cd*]pireno (50 µM), trifenileno (10 µM) coroneno (20 µM) ou produtos de oxidação (quinonas ou hidroquinonas acetiladas nas concentrações dos seus respectivos HPAs) por 16 horas, 37°C e 5% de CO₂.

Decorrido o período de incubação, as células foram removidas das placas e o homogenato obtido foi dividido em 4 partes iguais que foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 g, 10°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação do MDA, como descrito abaixo. O precipitado foi lavado com 250 µL de PBS e centrifugado 1500 g, 10 minutos, 10°C (2 vezes).

Em seguida, foram adicionados 250 µL de PBS e 100 µL de ácido perclórico (HClO₄) 2 M/EDTA 4 mM para lisar as células do precipitado. A suspensão foi centrifugada a 8000 g, por 5 minutos, 10°C. O sobrenadante foi descartado e o

precipitado ressuspenso em 100 μ L de NaOH 300 mM e utilizado para dosagem de proteínas, como descrito no item **3.4.4.3.** de materiais e métodos.

3.5.11. Reação de MDA com TBA

O método é baseado na reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com malonaldeído (MDA), sendo o produto dosado por HPLC com detecção de absorvância em 532 nm.

A cada tubo contendo 5 mL do sobrenadante das células foram adicionados 5 mL de solução de TBA (0,4 % em HCl 0,2 N: H₂O, 2:1) preparada imediatamente antes do uso e 600 μ L de hidroxitolueno butilado (BHT) (0,2 % em etanol 95%). As amostras foram incubadas em banho-maria a 90 °C por 45 minutos. Após incubação, o aduto (fase rosa) foi extraído com n-butanol (v/v). Diluiu-se então a fase n-butanólica com metanol 1:1 (amostra:metanol) para injeção no sistema de HPLC/PDA.

Para quantificação do aduto MDA-TBA, foi construída uma curva de calibração utilizando uma solução estoque de MDA preparada como descrito abaixo:

Bisdietilacetato de malonaldeído (22 mg) foi dissolvido em 10 mL de H₂SO₄ 1 % (v/v). A solução ficou em repouso por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, foram avolumados 10 μ L dessa solução para 1000 μ L de H₂SO₄ 1 % (v/v). A concentração do MDA estoque foi determinada medindo-se a absorvância a 245 nm contra um branco de H₂SO₄ 1 %.

Para a construção da curva padrão foram preparadas soluções de MDA 1, 5, 10, 20 e 40 μ M em H₂SO₄ 1 % e meio de cultura sem fenol red em volume final de 1 mL. Em seguida foi adicionado 1 mL de TBA (0,4 % em HCl 0,2 N: H₂O, 2:1) e feita incubação por 45 minutos a 90°C.

Após incubação, o aduto (fase rosa) foi extraído com n-butanol (v/v). Diluiu-se então a fase n-butanólica com metanol 1:1 (amostra:metanol) para injeção no sistema de HPLC/PDA.

3.5.12. Análise do aduto MDA-TBA por HPLC/PDA

Para análise do aduto MDA-TBA foi utilizado um sistema de HPLC/PDA (ver item **3.2.9**) A eluição foi feita através de uma coluna Shim-Pack C 18 (150 mm x 4,6 mm, id 5 μ m) com fluxo de 1,4 mL/min de um gradiente de acetonitrila/água como descrito no item **3.2.16 método V** de materiais e métodos. Controle da temperatura da coluna constante em 30°C. O comprimento de onda foi fixado em 532 nm. Nestas condições, o tempo de retenção do aduto MDA-TBA foi de 16-19 minutos.

3.6. Análise estatística

A análise de variância (ou ANOVA, de Analysis of Variance) foi aplicada para verificação de diferenças estatísticas entre os níveis de danos em células controles e em células incubadas com as substâncias de interesse. A média e desvio padrão foi calculada para cada grupo foram calculadas para cada grupo. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$ entre os dados comparados. Os cálculos estatístico fora realizados utilizando um software GraphPad inStat.

Para as comparações entre linhagens foi utilizado testes de duas vias (two way ANOVA) e os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do software GraphPad Prism.