

ARQUIVO TECNICO

8302
Sa55a(RCET)
019111



04592



019111

CETESB

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL



CETESB

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

PROCOP

PROGRAMA DE CONTROLE DE POLUIÇÃO
PROGRAMA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA

DIRETORIA DE DESENVOLVIMENTO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES AMBIENTAIS
DIVISÃO DE ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS AMBIENTAIS

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL
BIBLIOTECA Prof. Dr. Lucas Nogueira Garcez
Av. Prof. Frederico Hermann Junior, 345 - Pinheiros
05489-900 - SÃO PAULO - BRASIL

PROCOP

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE MATERIAL
PARTICULADO DE AR EM ÁREAS INDUSTRIAIS
E URBANAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, ATRAVÉS
DE BIOENSAIOS MICROBIANOS - INTEGRAÇÃO COM
PROGRAMAS DE CONTROLE DE POLUIÇÃO DO AR

SÃO PAULO
JULHO / 1996

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL
CETESB

19112-cr2

8302
Sa55a(RCET)
019112
Ex. 2

DOCUMENTO

TIPO	DATA	ORIGEM	Nº PÁGINA/V. 136 + anexos	Nº MAPAS 0
Relatório Técnico	Julho/1996	DAM		

TÍTULO DO DOCUMENTO

AValiação da GENOTOXICIDADE DE MATERIAL PARTICULADO DE AR EM ÁREAS INDUSTRIAIS E URBANAS DO ESTADO DE SÃO PAULO ATRAVÉS DE BIOENSAIOS MICROBIANOS - INTEGRAÇÃO COM PROGRAMAS DE CONTROLE DE POLUIÇÃO DO AR

AUTOR RESPONSÁVEL

ASSINATURA / CARIMBO / DATA

Gisela Valent
GISELA UMBUZEIRO VALENT
Gerente do Setor de Mutagênese e Citotoxicidade
Reg. 01.4491-0 - CBB 02110-84

DOCUMENTO AUTORIZADO POR

ASSINATURA / CARIMBO / DATA

Petra S. Sanchez
Dra. PETRA S. SANCHEZ
Gerente do Departamento de Análises Ambientais
Reg. n.º 01.0113-6
CBB n.º 4078

DOCUMENTO REVISADO

ASSINATURA / CARIMBO / DATA

Maria Inês Zanoli Sato
PI MARIA INÊS ZANOLI SATO
Gerente da Divisão de Análises Microbiológicas Ambientais
Reg. n.º 01.2443-1 CBBM 3556

CLASSIFICAÇÃO DE SEGURANÇA

EXTERNA INTERNA
 RESERVADA

AUTORES/ENTIDADES OU UNIDADES A QUE PERTENCEM

Petra S. Sanchez	DA
Maria Inês Z. Sato	DAM
Gisela U. Valent	DAMM
Maria Cristina L.S. Coelho	DAMP
Carlos Alberto Coimbra	DAMP
Paulo Fernando Rodrigues	DAMM
Lúcia A. Straceri	DDAA
Cláudio D. Alonso	EQ

PALAVRAS CHAVES

Material particulado de ar, mutagenicidade, teste de Ames, teste de Kado, Mutação Direta, Cromoteste, Induteste.

CÓDIGO E TÍTULO DO PROJETO

65.12.00

Avaliação da genotoxicidade de material particulado de ar em áreas industriais e urbanas do Estado de São Paulo, através de bioensaios microbianos - Integração com Programas de Controle de Poluição do Ar.

DISTRIBUIÇÃO INTERNA

ÁREAS/Nº DE CÓPIAS

DAMM - 1 / DAM - 1 / DTSI - 2 / ACA - 2

USO DA BIBLIOTECA

CLASSIFICAÇÃO DE ASSUNTO	Nº DOCUMENTO	VISTO / CARIMBO / DATA

Extratos orgânicos de material particulado de ar, procedentes da região urbana de São Paulo (Parque Dom Pedro e Pinheiros) e área industrial de Cubatão (Vila Parisi), foram avaliados quanto ao potencial mutagênico, através de bioensaios microbianos. O material particulado foi coletado usando amostradores HI-VOL e extraídos em diclorometano por ultra-sonicação. Amostras combinadas formando "pools" sazonais foram testadas frente a dois ensaios de mutação gênica reversa com *S.typhimurium*: teste de Ames (TA98, TA98NR, TA98/1, 8DNP₆, TA100) e teste de Kado (TA98, TA97a, TA100 e TA104), frente ao ensaio de mutação direta ("microforward") em *S.typhimurium* TM677 e frente aos ensaios baseados na resposta SOS, Cromoteste e Induteste. Amostras com a maior concentração mensal de material particulado foram avaliadas frente ao teste de Ames. Todas as amostras analisadas apresentaram atividade mutagênica, com maior número de revertentes frente às linhagens TA98 e TA97a na ausência de ativação metabólica, sugerindo a prevalência de mutágenos de ação direta, que causam deslocamento do quadro de leitura. Respostas obtidas frente à linhagem TA104 sugerem a presença de aldeídos com atividade mutagênica. Os níveis de mutagenicidade detectados em São Paulo (12 a 246 rev/m³) foram superiores aos de Vila Parisi (3 a 33 rev/m³), e similares aos dos grandes centros urbanos de outros países, onde as emissões veiculares são a principal fonte de poluição. Resultados obtidos com as linhagens TA98NR e TA98/1,8DNP₆, reforçados pelos dados obtidos no ensaio "microforward" sugerem a contribuição dos nitroarenos na mutagenicidade total das amostras estudadas. Os maiores níveis de mutagenicidade foram observados nos "pools" de primavera, em São Paulo, e verão, em Cubatão, e para as amostras mensais, no período de junho a novembro. Durante o inverno, resultados mais significativos foram detectados com a linhagem TA100 na presença de ativação metabólica, resposta típica dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos frente ao teste de Ames. O risco relativo dos índices de mutagenicidade detectados na atmosfera de São Paulo e Cubatão é considerado de potência moderada (10² a 10⁴ rev/mg), quando comparados com a mutagenicidade de outras misturas complexas, e similar àquele detectado para água potável e emissão de veículos automotores (gasolina). Os resultados desta pesquisa mostram a importância de bioensaios bacterianos simples na caracterização da mutagenicidade de poluentes atmosféricos, e sua aplicação no estabelecimento de prioridades para os Programas de Controle da Poluição do Ar e ações regulamentadoras.

OBSERVAÇÕES

USO DA BIBLIOTECA

LOCAL	EDITORA
IDIOMA PORTUGUÊS <input type="checkbox"/> INGLÊS <input type="checkbox"/> ESPANHOL <input type="checkbox"/> FRANCÊS <input type="checkbox"/> ALEMÃO <input type="checkbox"/> ITALIANO <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/>	
SÉRIE	

RELATÓRIO FINAL DO PROJETO

1. DADOS RELATIVOS AO PROGRAMA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA

1.1. Programa de Assistência Técnica

Coordenador: Luís Carlos da Costa

Qualificação profissional: economista

1.2. Número do Programa: -

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL
BIBLIOTECA

2. DADOS RELATIVOS AO PROJETO

2.1. TÍTULO:

Avaliação da genotoxicidade de material particulado de ar em áreas industriais e urbanas do Estado de São Paulo, através de bioensaios microbianos - Integração com programas de Controle de Poluição do Ar.

2.2. NÚMERO DA O.S.: 65.12.00

2.3. REGIÃO ABRANGIDA PELO TRABALHO DO PROJETO

. Região metropolitana da cidade de São Paulo

. Vila Parisi (Cubatão)

2.4. UNIDADE ENCARREGADA

. Diretoria de Desenvolvimento e Transferência de Tecnologia (D)

. Departamento de Análises Ambientais (DA)

. Divisão de Análises Microbiológicas Ambientais (DAM)

. Setor de Mutagênese e Citotoxicidade (DAMM)

. Setor de Microbiologia e Parasitologia (DAMP)

2.5. ELEMENTOS RESPONSÁVEIS PELO PROJETO

2.5.1. Coordenador do projeto

Nome: Petra Sanchez Sanchez
Qualificação profissional: Farmacêutica-bioquímica, Doutora em Ciências -
Área: Microbiologia.
Cargo: Gerente do Departamento de Análises Ambientais

2.5.2. Equipe técnica

2.5.2.1. Nome: Maria Inês Zanoli Sato
Qualificação profissional: Biomédica, Mestre - Área Microbiologia e
Imunologia, Doutora em Ciências - Área:
Microbiologia
Cargo: Gerente da Divisão de Análises Microbiológicas
Ambientais

2.5.2.2. Nome: Gisela Umbuzeiro Valent
Qualificação profissional: Bióloga, Mestre e Doutora em Ciências Biológicas -
Área: Genética
Cargo: Gerente do Setor de Mutagênese e Citotoxicidade

2.5.2.3. Nome: Maria Cristina L. S. Coelho
Qualificação profissional: Biomédica, Mestre em Ciências Biológicas - Área:
Genética
Cargo: Biomédica

2.5.2.4. Nome: Carlos Alberto Coimbra
Qualificação profissional: 2º Grau
Cargo: Técnico de Laboratório Avançado

2.5.2.5. Nome: Paulo Fernando Rodrigues
Qualificação profissional: Biólogo
Cargo: Biólogo

2.5.2.6. Nome: Lúcia A. Straceri

Qualificação profissional: Química

Cargo: Química

2.5.2.7. Nome: Cláudio D. Alonso

Qualificação profissional: Químico

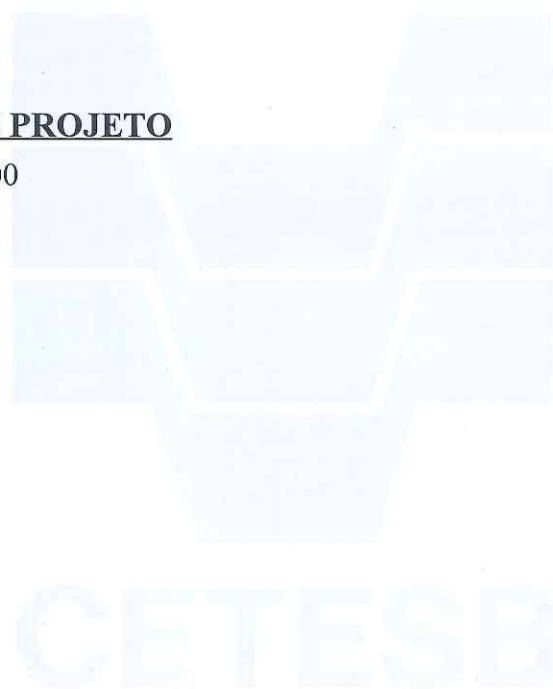
Cargo: Gerente do Departamento de Qualidade Ambiental

2.6. PERÍODO DE ELABORAÇÃO DO PROJETO

02.01.90 a 30.06.96

2.7. CUSTO DO PROJETO

R\$ 154.000,00



3. INFORME RELATIVO AO PROJETO

SUMÁRIO

	pg.
3.1. Resumo	05
3.2. Summary	06
3.3. Introdução	07
3.4. Objetivos	08
3.5. Justificativa	08
3.6. Revisão de literatura	09
3.7. Material e Métodos	22
3.8. Resultados	36
3.9. Discussão	47
3.10. Conclusões e Recomendações	66
3.11. Referências Bibliográficas	69
3.12. Agradecimentos	82
3.13. Anexos do Informe	83

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA DE SANTAMENTO AMBIENTAL
BIBLIOTECA

3.1. RESUMO

Extratos orgânicos de material particulado de ar procedentes da região urbana de São Paulo (Parque Dom Pedro e Pinheiros) e área industrial de Cubatão (Vila Parisi) foram avaliados quanto ao potencial mutagênico, através de bioensaios microbianos. O material particulado foi coletado usando amostradores HI-VOL e extraídos em diclorometano por ultrasonicação. Amostras combinadas formando "pools" sazonais foram testadas frente a dois ensaios de mutação gênica reversa com *S.typhimurium*: teste de Ames (TA98, TA98NR, TA98/1,8DNP₆, TA100) e teste de Kado (TA98, TA97a, TA100 e TA104), frente ao ensaio de mutação direta ("microforward") em *S.typhimurium* TM677 e frente aos ensaios baseados na resposta SOS, Cromoteste e Induteste. Amostras com a maior concentração mensal de material particulado foram avaliadas frente ao teste de Ames. Todas as amostras analisadas apresentaram atividade mutagênica, com maior número de revertentes frente às linhagens TA98 e TA97a na ausência de ativação metabólica, sugerindo a prevalência de mutágenos de ação direta que causam deslocamento do quadro de leitura. Respostas obtidas frente à linhagem TA104 sugerem a presença de aldeídos com atividade mutagênica. Os níveis de mutagenicidade detectados em São Paulo (12 a 246 rev/m³) foram superiores aos de Vila Parisi (3 a 33 rev/m³), e similares aos dos grandes centros urbanos de outros países, onde as emissões veiculares são a principal fonte de poluição. Resultados obtidos com as linhagens TA98NR e TA98/1,8DNP₆, reforçados pelos dados obtidos no ensaio "microforward" sugerem a contribuição dos nitroarenos na mutagenicidade total das amostras estudadas. Os maiores níveis de mutagenicidade foram observados nos "pools" de primavera, em São Paulo, e verão, em Cubatão, e para as amostras mensais, no período de junho a novembro. Durante o inverno, resultados mais significativos foram detectados com a linhagem TA100 na presença de ativação metabólica, resposta típica dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos frente ao teste de Ames. O risco relativo dos índices de mutagenicidade detectados na atmosfera de São Paulo e Cubatão é considerado de potência moderada (10² a 10⁴ rev/mg), quando comparados com a mutagenicidade de outras misturas complexas, e similar aquele detectado para água potável e emissão de veículos automotores (gasolina). Os resultados desta pesquisa mostram a importância de bioensaios bacterianos simples na caracterização da mutagenicidade de poluentes atmosféricos, e sua aplicação no estabelecimento de prioridades para os Programas de Controle da Poluição do Ar e ações regulamentadoras.

3.2. RESUMO EM INGLÊS (SUMMARY)

The mutagenicity of airborne particulate matter at three different sites from São Paulo urban area and the Cubatão industrial area, São Paulo State, Brazil, was evaluated using microbial assays over a one year period (June/1990-May/1991). Total suspended particles (TSP) were collected using a HI-VOL sampler and extracted with methylene chloride by ultrasonication. Pooled seasonal extracts were tested using Ames *Salmonella* mammalian microsome mutagenicity assay (TA98, TA98NR, TA98/1,8DNP₆, TA100); Kado test/ *Salmonella typhimurium* micropreincubation assay (TA97a, TA98, TA100, TA104); *S.typhimurium* TM677 microforward assay; SOS bioassays (Chromotest and Phage induction) with and without metabolic activation. Organic extracts of the samples with the highest monthly TSP concentration were also assayed for mutagenicity using Ames test. All samples collected at São Paulo and Cubatão showed mutagenicity with higher number of revertants for strains TA98 and TA97a, and in general, the addition of S9 did not modify the mutagenic response, suggesting the prevalence of direct-acting frameshift mutagens in the atmosphere of these sites. Responses of strain TA104 suggested the presence of mutagenic aldehydes. The levels of mutagenicity detected in the urban areas of São Paulo, mainly downtown (12 to 246 rev/m³) was higher than in the Cubatão industrial area (5 to 33 rev/m³) and similar to the more urbanized cities in the world, where vehicle emissions are the major pollution source. Results obtained with the strains TA98NR and TA98/1,8DNP₆, in addition to the data from microforward assay, suggested the contribution of mononitro- and dinitroarenes to the mutagenicity of these atmospheric samples. A seasonal variation was observed with higher levels of frameshift mutagens, detected with strain TA98, during Spring in São Paulo and Summer in Cubatão. During the Winter, more significant responses were found with strain TA100 in the presence of S9 at all sites, indicating presence of promutagens in these samples. Monthly samples presented high levels of mutagenicity during the period of June to November. The relative risks of the mutagenicity detected in ambient air of São Paulo and Cubatão is considered of moderate potency (10² to 10⁴ rev/mg) when compared with the mutagenicity of other complex mixtures, and similar to those found for drinking water and auto exhaust (gasoline). Results from this research provide support for Air Pollution Control Programs in the detection of the more potent organic mutagenic compounds in the atmosphere and may help in the establishment of priorities and regulatory actions.

3.3. INTRODUÇÃO

É crescente em nosso meio a preocupação com o efeito causado à saúde humana pelos agentes tóxicos presentes no ar atmosférico. Estudos epidemiológicos têm atribuído e correlacionado diversos casos de doenças do aparelho respiratório com poluentes químicos presentes no ar, visto que amostras atmosféricas podem conter, dentre os poluentes mais comuns, aqueles com atividades genotóxica e/ou mutagênica, principalmente na fração orgânica do material particulado do ar. Esses agentes vêm sendo relacionados com a iniciação de processos cancerígenos, uma vez que estes poluentes podem interagir com o material genético dos seres vivos e contribuir para o aumento da incidência de câncer nas populações expostas. Além disso, esses agentes químicos podem levar ao aumento das doenças hereditárias nas populações quando agem sobre as células germinativas dos indivíduos.

A detecção desses compostos nas amostras de material particulado de ar pode ser realizada, tanto através da identificação química, como através de bioensaios, medindo-se diretamente sua atividade genotóxica e/ou mutagênica. Como essas amostras são de natureza muito complexa dada a diversidade de compostos químicos presentes em concentrações variáveis, a identificação química requer vários passos de fracionamento químico, além da utilização de equipamentos sofisticados de alto custo, dificultando a análise de um grande número de amostras concomitantemente, como é necessário em estudos de monitoramento.

Os ensaios biológicos por sua vez, têm se mostrado uma ferramenta muito útil na avaliação da atividade genotóxica de amostras complexas, destacando-se principalmente os ensaios microbianos que são bastante sensíveis, têm custo relativamente baixo, são de fácil execução, rápida resposta e bastante confiáveis, além de mostrarem boa correlação com os ensaios que utilizam animais.

A análise de amostras atmosféricas através desses ensaios tem permitido avaliar a presença e distribuição desses poluentes genotóxicos e/ou mutagênicos em regiões industriais e urbanas, podendo auxiliar na localização das fontes poluidoras, e fornecer subsídios de grande valia para as ações de planejamento e de controle da poluição do ar.

No Brasil, cidades como São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte, com sérios problemas de poluição atmosférica devido a emissões industriais e de veículos automotores, apresentam programas para avaliação da qualidade do ar bem estabelecidos, baseados no atendimento da Resolução N° 3 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 1990), que regulamenta os seguintes parâmetros: partículas totais em suspensão, fumaça, partículas inaláveis, dióxido de enxofre, monóxido de carbono, ozônio e dióxido de nitrogênio. Entretanto, poucos estudos têm sido realizados

para caracterizar os compostos orgânicos e medir a atividade biológica do material orgânico atmosférico nessas áreas (MIGUEL *et al.*, 1990; SANCHEZ *et al.*, 1990; SATO *et al.*, 1991).

Com o intuito de caracterizar amostras atmosféricas quanto a atividade genotóxica utilizando bioensaios microbianos foi realizado o presente trabalho.

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL
BIBLIOTECA

3.4. OBJETIVOS

- Caracterizar amostras de extrato orgânico de material particulado de ar quanto a presença de atividade genotóxica, em áreas com influência de poluição industrial e urbana nas cidades de São Paulo e Cubatão, através da utilização de bioensaios microbianos, visando fornecer subsídios que possam auxiliar no estabelecimento de metas e critérios para uma política adequada às ações de controle da poluição do ar.
- Implantar e avaliar diferentes ensaios microbianos utilizados na detecção de substâncias genotóxicas em material particulado de ar, visando conhecer a aplicabilidade dos mesmos na avaliação da qualidade do ar.

3.5. JUSTIFICATIVA

A CETESB mantém uma constante vigilância da qualidade do ar através de sua rede automática de monitoramento, distribuída em diversos locais da região metropolitana de São Paulo e Cubatão, na Baixada Santista. Porém em relação aos compostos orgânicos, devido à dificuldade da sua identificação em misturas complexas, o único parâmetro avaliado é o carbono total, que não fornece informação direta sobre a presença de compostos orgânicos genotóxicos na atmosfera.

Os recentes avanços ocorridos na área de Toxicologia Molecular têm contribuído significativamente para a implantação de metodologias bastantes úteis na detecção de atividade genotóxica de compostos orgânicos procedentes de emissões atmosféricas. Entre os vários sistemas biológicos disponíveis, os ensaios microbianos têm se mostrado uma ferramenta muito útil na avaliação da atividade genotóxica principalmente porque são bastante sensíveis, de custo relativamente baixo, e são de fácil execução, além de mostrarem boa correlação com os ensaios em animais de laboratório.

A CETESB, como órgão de promoção e desenvolvimento ambiental, deve manter-se constantemente atualizada em relação a novas metodologias de análise para

detecção de poluentes atmosféricos, visando o controle e monitoramento adequado da qualidade do ar, bem como a preservação da saúde humana.

Os laboratórios da Divisão de Análises Microbiológicas Ambientais da CETESB executam desde 1980 vários ensaios biológicos que vêm sendo utilizados por vários órgãos de Controle Ambiental nos Estados Unidos e em outros países na avaliação da atividade mutagênica presente em amostras ambientais, sendo que no decorrer deste projeto pretende-se implantar e padronizar métodos de análise para a caracterização de poluentes genotóxicos em amostras de ar.

A realização deste projeto permitirá analisar a distribuição e o potencial genotóxico de amostras de ar de áreas sujeitas a poluição ambiental por diferentes tipos de emissões, tais como combustão de veículos a álcool e gasolina, indústrias, incineradores, etc, proporcionando a oportunidade de localizar possíveis fontes poluidoras destes agentes. Portanto, o projeto fornecerá subsídios de importância para os Programas de Controle da Poluição do Ar, dando suporte às ações para minimizações dos efeitos nocivos à saúde das populações expostas, contribuindo com as ações preventivas de saúde da comunidade, que vêm sendo uma das prioridades do Governo do Estado de São Paulo. No que se refere à legislação ambiental, fornecerá subsídios para a complementação e aprimoramento de critérios e padrões de qualidade do ar relativa à presença de compostos genotóxicos.

Dessa forma, o PROCOP, com o apoio do Governo do Estado e do Banco Interamericano de Reconstrução e Desenvolvimento irá possibilitar um grande desenvolvimento da área, permitindo à CETESB ampliar seu instrumental diagnóstico seja quanto a equipamentos, seja quanto a formação e especialização de recursos humanos que em conjunto proporcionarão uma ação mais efetiva no atendimento à situações de emergência e prevenção da ocorrência de episódios críticos de poluição atmosférica.

3.6. REVISÃO DE LITERATURA

3.6.1. POLUENTES ATMOSFÉRICOS

Os poluentes presentes na atmosfera podem ser classificados, de acordo com sua origem, em primários e secundários. Os poluentes atmosféricos primários são aqueles liberados diretamente na atmosfera e podem ser naturais (poeira, aerossóis, erupções vulcânicas, processos biogênicos, etc) ou de origem antrópica (emissões de combustão de veículos, indústrias, incineradores, vegetação, etc). Como poluentes primários

podemos citar os hidrocarbonetos, óxidos de nitrogênio, dióxido de enxofre, monóxido de carbono e orgânicos voláteis. Os poluentes secundários são formados na atmosfera a partir dos poluentes primários através de reações fotoquímicas. Assim, inúmeros compostos como ozônio, gases ácidos, dióxido de nitrogênio, peroxiacetil nitrato (PAN), sulfatos, nitratos e compostos orgânicos oxidados são gerados na atmosfera sob ação da luz e de radicais livres (OH e HO₂) (FINLAYSON-PITTS & PITTS, 1986; HUGHES *et al.*, 1980; VanHOUDT, 1990).

O material particulado presente na atmosfera pode ser definido como uma mistura de compostos sólidos e líquidos dispersos em um meio gasoso, com diâmetro das partículas variando entre $\approx 0,002 \mu\text{m}$ até $\approx 100 \mu\text{m}$. Estudos realizados para determinar o tempo de vida dos aerossóis no ar sugerem que partículas com menos de $5 \mu\text{m}$ de diâmetro podem permanecer suspensas por mais de 100 horas, embora a remoção pelas chuvas possa diminuir esse tempo de retenção (FINLAYSON-PITTS & PITTS, 1986).

A distribuição relativa de poluentes atmosféricos entre a fase gasosa e material particulado depende da pressão de vapor, polaridade das moléculas e temperatura. Dessa forma, compostos orgânicos da fase gasosa podem se adsorver à matriz particulada em condições determinadas de temperatura, se possuírem polaridade adequada.

Embora somente 6% do material particulado do ar seja de origem antrópica, isso não quer dizer que o risco de exposição humana seja de menor importância. Diferenças na composição química e física podem levar a efeitos nocivos à saúde totalmente diferentes dos aerossóis naturais (VanHOUDT, 1990).

As substâncias orgânicas são, após os sulfatos, o segundo maior constituinte das partículas finas na atmosfera. Uma grande variedade de compostos orgânicos têm sido detectados na atmosfera, sendo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) e seus derivados nitrosos, muitos deles formados na atmosfera através de reações fotoquímicas, os que têm merecido maior atenção, devido ao seu potencial cancerígeno (HUGHES *et al.*, 1980, VanHOUDT, 1990). Esses compostos resultam primariamente da combustão incompleta de matéria orgânica e são gerados principalmente pela queima de carvão, óleo e gás nas indústrias, veículos automotores, incineradores, entre outros (HUGHES *et al.*, 1980).

3.6.2. POLUIÇÃO DO AR E CÂNCER

A primeira observação das propriedades cancerígenas de produtos gerados em processos de combustão foi feita por Sir Percival Pott em 1775, que associou a alta incidência de câncer de escroto em limpadores de chaminé de Londres com períodos prolongados de exposição ao alcatrão e à falta de higiene.

Já neste século, a partir da década de 40, uma série de trabalhos foi realizada com amostras *in natura* e extratos orgânicos de amostras de ar. Foram realizados vários ensaios biológicos com ratos por exposição dérmica, sub-cutânea e por inalação. Os resultados mostraram que essas amostras eram cancerígenas.

A atividade biológica observada no material particulado não é surpreendente, porque esse material contém benzo(a)pireno (BaP) e outros hidrocarbonetos policíclicos aromáticos relacionados, relatados na literatura mundial em aerossóis urbanos. Esses compostos são encontrados em partículas de 1 µm de diâmetro coletadas de fontes primárias como emissão de veículos automotores, fumaça de combustão de madeira em residências, indústrias, usinas de energia, entre outros, os quais penetram profundamente nos pulmões e se depositam nos alvéolos. Associados a esses hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, encontram-se também outros compostos, incluindo seus análogos nitrogenados tais como os azo-arenos (carbazóis e indóis) e as benzacridinas e dibenzacridinas, conhecidos por seu alto potencial cancerígeno (PITTS, 1985).

Outra consideração importante é que os extratos orgânicos de material particulado de ar apresentaram potencial cancerígeno, em animais, significativamente maior do que o esperado para as quantidades de compostos aromáticos policíclicos conhecidamente cancerígenos determinados analiticamente nas amostras (EPSTEIN *et al.*, 1966; HUEPER *et al.*, 1962; KOTIN *et al.*, 1954). Este fato sugere a presença de outros compostos químicos, não conhecidos, com forte atividade biológica nesses extratos.

Apesar do grande interesse e esforço da comunidade científica desde o início da década de 70 em isolar e identificar os compostos químicos presentes em extratos orgânicos de material particulado de ar responsáveis por essa elevada atividade biológica, bem como determinar suas origens, reações e destino, o progresso destes estudos foi muito lento. Esses compostos biologicamente ativos estão presentes em concentrações-traço no material particulado de ar, e os testes para medir a atividade cancerígena usando animais são muito demorados e onerosos para serem usados regularmente como componente principal da medida de atividade biológica no isolamento e caracterização de carcinógenos suspeitos. Entretanto, com o surgimento da toxicologia genética e o desenvolvimento, na metade da década de 70, de ensaios bacterianos sensíveis e de curta duração para detecção de mutágenos químicos, como o

teste de Ames (AMES *et al.*, 1973, 1975), houve uma mudança significativa nessa situação .

Considerando-se a importância da mutação nos diferentes processos cancerígenos e a alta correlação entre carcinógenos e mutágenos encontrada para algumas classes de compostos presentes na atmosfera, tais como aminas aromáticas, nitrocompostos, PAHs e agentes alquilantes, os ensaios de mutagenicidade utilizando microrganismos, principalmente o teste de Ames, se constituíram em um marco no estudo da poluição do ar, pois, integrado com análises químicas, tem permitido elucidar a contribuição dos poluentes orgânicos mutagênicos e potencialmente cancerígenos na poluição atmosférica das mais diversas regiões do mundo, bem como caracterizar as principais fontes de emissões dessas substâncias e os níveis a que as populações estão expostas.

3.6.3. ENSAIOS MICROBIANOS PARA ANÁLISE DE MUTÁGENOS ATMOSFÉRICOS

Atualmente, existem mais de uma centena de bioensaios de curta duração, utilizando desde linhagens de células bacterianas e fagos até células humanas, para detectar o potencial mutagênico e cancerígeno de substâncias químicas e misturas complexas (HOFNUNG & QUILLARDET, 1986; HOLLSTEIN *et al.*, 1979). Alguns desses ensaios têm sido empregados na avaliação da atividade mutagênica de extratos orgânicos de material particulado de ar e de emissões primárias de veículos automotores e combustão de carvão e madeira (CHRISP & FISHER, 1980; KRISHNA *et al.*, 1986; LEWTAS, 1988).

O bioensaio mais extensivamente utilizado na avaliação da mutagenicidade de poluentes atmosférico tem sido o teste de Ames. Apesar das muitas vantagens do teste de Ames e de sua aplicação ampla no mundo todo, houve um esforço muito grande no desenvolvimento de metodologias mais sensíveis, uma vez que para muitas amostras ambientais, principalmente as amostras atmosféricas, não se dispõe de volume ou massa de extratos orgânicos significantes para teste frente a uma maior diversidade de linhagens e condições de metabolização.

KADO *et al.*, em 1983, desenvolveram uma modificação simples da técnica de pré-incubação do teste de Ames para detecção de mutágenos em urina, posteriormente utilizada na determinação de atividade mutagênica de material particulado do ar (KADO *et al.*, 1986; LÖFROTH, 1990; AGURELL & STENTSMAN, 1992). A modificação consiste em misturar uma concentração dez vezes maior de bactérias (aproximadamente 10^9 bactérias) em um volume 20 vezes menor de amostra, reduzindo

também de 5 a 10 vezes o volume da mistura S9 (enzimas de metabolização), em relação ao método convencional do teste de Ames.

Um outro ensaio que foi modificado para tornar possível a análise de pequenos volumes de amostras foi o ensaio de mutação direta em *Salmonella typhimurium* (LEWTAS *et al.*, 1987). Nos ensaios de mutação direta, o alvo para o mutágeno é o gene estrutural (e possivelmente genes reguladores), que codifica para uma enzima que converte um composto não tóxico (8-azaguanina) para um metabólito tóxico. A perda da enzima por mutação resulta em resistência ao agente seletivo e permite a seleção de mutantes em uma população tratada. Este ensaio pode detectar mutações por substituições de pares de base ou deslocamento do quadro de leitura, que se expressam fenotipicamente como resistência a 8-azaguanina. A vantagem desse ensaio está na possibilidade de utilização de uma única linhagem de *Salmonella*; ao contrário dos ensaios de mutação reversa, como os testes de Ames e Kado, que requerem várias linhagens para a realização de um teste completo.

Outros ensaios que utilizam somente uma linhagem bacteriana foram desenvolvidos e dentre estes destacam-se aqueles baseados no sistema de reparo S.O.S., tais como o Cromoteste e o Induteste. Estes ensaios são capazes de detectar, além das mutações de ponto, quebra das cadeias do DNA. Como o "endpoint" destes ensaios é a detecção da lesão do material genético (através da indução do sistema de reparo), independente da ocorrência ou não da mutação, a sensibilidade dos mesmos é maior (ELESPURU & YARMOLINSKY, 1979; QUILLARDET *et al.*, 1982).

A avaliação da mutagenicidade do material particulado de ar através da utilização de bioensaios microbianos inclui uma lista extensa de trabalhos. A seguir serão citados os de maior relevância no monitoramento da qualidade do ar e na comparação entre vários bioensaios.

TOKIWA *et al.* (1977) avaliaram a atividade mutagênica de material particulado de ar coletado de seis locais diferentes da área industrial de Ohmuta e da área residencial de Fukuoka, Japão. As amostras extraídas em metanol foram submetidas ao teste de Ames frente a várias linhagens de *S. typhimurium* na presença da fração microsomal S9. Todas as amostras apresentaram atividade mutagênica significativa e o número de revertentes/m³ foi mais elevado para as áreas industriais (22,2 à 445 rev/m³) do que para as áreas residenciais (7,1 à 77,6 rev/m³).

TALCOTT & WEI (1977) analisaram amostras atmosféricas coletadas em Buffalo, New York, e na Universidade de Berkeley, Califórnia, frente ao teste de Ames. O material orgânico extraído em acetona foi mutagênico para as três linhagens testadas. A adição de S9 reduziu a atividade mutagênica do extrato orgânico da amostra de Berkeley, indicando a presença de mutágenos de ação direta, enquanto a amostra de

Buffalo, coletada próxima a uma fábrica de aço, teve sua atividade mutagênica potencializada pela ação de S9, indicando a presença de promutágenos.

PITTS *et al.* (1977) analisaram extratos orgânicos de material particulado da atmosfera de oito áreas urbanas (Anaheim, Banning, Lennox, Los Angeles, Los Alamitos, Pasadena, Pomona e Riverside) e uma área suburbana (Camp Paivika - Montanha de São Bernardino) no Sul da Califórnia frente ao teste de Ames. Todas as amostras de ar urbano apresentaram atividade mutagênica para as linhagens de *S. typhimurium* que causam deslocamento do quadro de leitura, e esta atividade não foi potencializada pela adição de S9. Os autores sugerem a presença nessas amostras de outros mutágenos que não o benzo(a)pireno e outros hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, os quais requerem ativação metabólica. A potência mutagênica variou de 0,10 a 0,44 revertentes por μg de carbono orgânico, sendo este último valor observado na amostra coletada em Los Angeles. A amostra de Camp Paivika, região isenta de poluição atmosférica, não apresentou atividade mutagênica.

Variações sazonais na mutagenicidade de material orgânico particulado ($<3,5 \mu\text{m}$) da atmosfera de Nova York foram estudadas também por DAISEY *et al.* (1980) durante o período de julho de 1977 a março de 1979. O máximo de atividade mutagênica direta por metro cúbico, obtida nas frações polares, foi detectado no inverno, enquanto as frações não polares e moderadamente polares exibiram valores máximos no outono e inverno. Os autores concluem, baseados nesses resultados e considerando as principais fontes de material particulado orgânico, que as emissões geradas das combustões para aquecimento de ambiente, no inverno, contribuem para aproximadamente metade da atividade mutagênica por metro cúbico em Nova York.

TALCOTT & HARGER (1980) estudaram a mutagenicidade de partículas atmosféricas de diferentes diâmetros, coletadas em Durhan, North Carolina, frente ao teste de Ames, e observaram que 52 a 98% da atividade mutagênica foi obtida nos extratos orgânicos dos filtros que coletaram as menores partículas ($< 2 \mu\text{m}$). A ativação metabólica não alterou significativamente a resposta mutagênica dessas amostras.

MOLLER *et al.* (1982) compararam a mutagenicidade de material particulado atmosférico coletado em Oslo, Noruega, ao nível da rua (2m) e a 25m de altitude através do teste de Ames. A atividade mutagênica das amostras coletadas ao nível da rua foi potencializada pela adição de S9 e variou com a intensidade do tráfego, assim como outros parâmetros atmosféricos, tais como CO, NO, e PAHs. A resposta mutagênica na presença de ativação metabólica das amostras coletadas a 25m foi 5 a 25% da atividade correspondente das amostras de rua. Os autores observaram uma redução de 15 a 35% da atividade mutagênica medida durante o dia para a medida durante a noite, mas apenas para as amostras de rua. O fracionamento químico dos extratos orgânicos obtidos em acetona mostraram que a atividade mutagênica da

amostra estava principalmente associada aos compostos policíclicos aromáticos. Somente os extratos de partículas com menos de 3 μm de diâmetro mostraram atividade mutagênica.

PITTS *et al.* (1982) estudaram as variações diurnas nos níveis de mutagenicidade de material particulado de ar em Los Angeles e Riverside, na costa sul da Califórnia, utilizando o teste de Ames e mostraram picos significativos de mutagenicidade nas horas de maior trânsito, principalmente no período de 6 às 9h. Esses índices de mutagenicidade foram muito maiores do que os valores médios de 24 h relatados na literatura, chegando a atingir valores de 170 revertentes/ m^3 em Los Angeles no inverno. A mutagenicidade obtida na linhagem TA98NR foi cerca de 50-69% mais baixa que a da TA98, o que evidencia a presença de nitroarenos nas amostras. Os autores observaram um aumento da contribuição de promutágenos na mutagenicidade das amostras durante os períodos de maiores emissões, valores esses que, subsequentemente, retornam a níveis iguais à atividade mutagênica direta, sugerindo que algumas substâncias promutagênicas presentes no material orgânico recentemente emitido estão sujeitas a rápida destruição na atmosfera. Neste estudo, as variações diurnas da potência mutagênica foram similares às variações das concentrações de monóxido de carbono, óxidos de nitrogênio e chumbo.

ALFHEIM *et al.* (1983) testaram extratos orgânicos de material particulado coletado da atmosfera de várias regiões da Escandinávia (Suécia e Noruega) frente ao teste de Ames e detectaram atividade mutagênica tanto na presença como na ausência de ativação metabólica com os maiores valores médios registrados durante o inverno. A resposta mutagênica variou de acordo com a velocidade do vento e estabilidade atmosférica e as amostras coletadas nas áreas urbanas foram consideravelmente mais mutagênicas que na área rural, sendo que os resultados sugerem que as emissões dos veículos automotores são a mais importante fonte de partículas com atividade mutagênica nas áreas urbanas.

ALINK *et al.* (1983) estudaram a atividade mutagênica de partículas atmosféricas da área rural de Wageningen, Holanda, durante o período de julho de 1979 a junho de 1980, usando o teste de Ames. Os resultados obtidos mostraram que a resposta mutagênica dos extratos orgânicos estava correlacionada com a direção do vento e índices de SO_2 , e a potência foi mais elevada no inverno do que no verão.

De RAAT (1983) relatou atividade mutagênica em partículas atmosféricas, extraídas com metanol, procedentes da área de Rijnmond, região altamente industrializada e densamente povoada da Holanda, usando o teste de Ames. Os maiores índices de mutagenicidade foram observados na presença de fração microssomal S9 (TA98: 68 rev/ m^3 ; TA100: 40 rev/ m^3) indicando a predominância de mutágenos indiretos.

TAKEDA *et al.* (1984) estudaram a mutagenicidade de amostras de ar procedentes de áreas industriais (Amagasaki), urbano-residencial (Kobe) e rural (Hamasaka) do Japão, utilizando a linhagem de *S. typhimurium* TA98 e, observaram um maior índice de mutagenicidade na área industrial de Amagasaki, atividade essa potencializada na presença de S9 (-S9: 14,41 rev/m³; +S9: 20,42 rev/m³). O potencial mutagênico das amostras da área rural de Hamasaka foi cerca de dez a quinze vezes menor que o da área industrial (-S9: 1,22 rev/m³; +S9: 1,23 rev/m³). Em Kobe, área urbana residencial, o valor médio de revertentes por m³ de ar foi de 9,41 na ausência de ativação metabólica e 7,74 na presença desse fator enzimático.

COURTOIS (1984), analisando material particulado coletado no centro da cidade de Paris, utilizando o teste de Ames e o Cromoteste, obteve resultados positivos para ambos os ensaios e observou que a genotoxicidade era maior quando se incluía sistema de metabolização (fração S9). O valor da concentração mínima efetiva (CME) obtida para o Cromoteste foi de 2 m³. Para o teste de Ames, os valores obtidos foram expressos em revertentes/m³ e variaram de 4 a 100 para TA98 e de 4 a 88 para TA100.

BUTLER *et al.* (1985, 1987) investigaram as variações da atividade mutagênica e composição química de frações orgânicas (ciclohexano, diclorometano e acetona) de material particulado da atmosfera de cinco centros urbanos (Philadelphia, PA; Nova York, NJ; Elizabeth, NJ; Pequim, China; e Cidade do México), os quais diferem na natureza das fontes de combustão. O resultado do teste de Ames (TA98) mostrou que na ausência de S9, a maior atividade foi observada na cidade do México (22,1 rev/m³), enquanto na presença de ativação microsossomal o maior valor foi registrado em Beijing (60 rev/m³).

ROSSMAN *et al.* (1985) compararam o teste de Ames e o Induteste para amostras de material particulado de ar de New York, Cidade do México, Beijing e Elizabeth, extraídos seqüencialmente em ciclohexano, diclorometano e acetona. As frações foram testadas em ambos ensaios e os resultados mostram que só o Induteste não foi capaz de detectar atividade mutagênica nas frações obtidas após extração com diclorometano nas amostras da Cidade do México e detectou uma resposta fraca para as amostras de New York. Os autores concluem que a fração obtida com diclorometano deve conter composto(s) que iniba(m) ou seja(m) tóxico(s) ao bacteriófago λ e portanto, mascarem um resultado positivo.

SASAKI *et al.* (1986) avaliaram a presença de mutágenos em material particulado de ar, extraído com benzeno-etanol por ultrassonicação, provenientes de diferentes regiões de Tóquio, utilizando o teste de Ames. Os resultados obtidos mostraram que a mutagenicidade direta e indireta tanto para a TA98 como TA100 foi mais elevada no inverno e outono do que na primavera e verão. A média de revertentes por m³ de ar na área urbana foi: 10,6 (TA100-S9), 8,2 (TA100+S9), 12,1 (TA98-S9). A

potência mutagênica na linhagem TA98NR (-S9) foi somente 20-91% da linhagem TA98 e a da linhagem TA98/1,8DNP₆ foi 0-65%, indicando uma maior contribuição dos dinitroarenos na mutagenicidade dessas amostras. A atividade mutagênica por m³ foi mais elevada nas amostras urbanas do que nas rurais, embora a atividade específica por mg de partículas apresentasse pequena diferença entre as duas áreas.

KADO *et al.* (1986), estudando a mutagenicidade de material particulado fino do ar (< 2,5 µm de diâmetro), relataram que o método de micro suspensão torna o ensaio aproximadamente dez vezes mais sensível do que o método padrão de incorporação em placa para detecção de mutágenos em extratos orgânicos de material particulado e foi aproximadamente 10 a 31 vezes mais sensível para detecção de compostos químicos mutagênicos.

LOUIS *et al.* (1987) relataram a mutagenicidade de partículas atmosféricas inaláveis coletadas nas cidades Newark, Elizabeth, Camden e a área rural de Ringwood no Estado de New Jersey, EUA, durante os anos de 1981 a 1983, frente ao teste de Ames. A linhagem mais sensível foi a TA98 e os maiores índices de mutagenicidade foram observados em Newark (25 rev/m³) e os menores em Ringwood (6,8 rev/m³). As amostras de inverno tiveram 2,8 a 4,5 vezes mais atividade mutagênica direta (-S9) e 1,4 a 1,9 vezes mais atividade mutagênica indireta (+S9) do que as amostras de verão.

LEWTAS *et al.* (1987) e LEWTAS (1988) testaram extratos de ar interno ("indoor") e emissões de diesel frente ao teste de mutação direta para microensaio com *S. typhimurium* (teste de Kado). Os resultados obtidos mostraram que este ensaio foi bastante eficiente na detecção da mutagenicidade nos extratos testados.

CREBELLI *et al.* (1988) estudaram a contribuição de nitrocompostos na mutagenicidade de amostras atmosféricas de Roma, Itália, durante o ano de 1986, no teste de Ames, usando as linhagens de *S. typhimurium* TA98, TA98NR e TA98/1,8DNP₆, e observaram que os nitropirenos têm uma contribuição relativamente maior na atividade mutagênica dos extratos orgânicos (diclorometano, Soxhlet) coletados durante a primavera e verão. O fracionamento dos extratos mostrou que os compostos neutros são responsáveis por 2/3 da atividade mutagênica total.

TUOMINEN *et al.* (1988) estudaram a atividade mutagênica de amostras de ar (fase particulada e gasosa) coletadas em áreas urbanas (Helsinki e Lahti) e rural (Ahtari) da Finlândia, frente à *S. typhimurium* TA98, TA100 e TA98NR no teste de Ames. Os resultados mostraram uma maior sensibilidade da linhagem TA98, embora atividade indireta, típica dos PAHs foi também observada com a TA100. As respostas mutagênicas foram significativamente mais elevadas durante o inverno, onde os resultados com a linhagem nitroreductase deficiente (TA98NR) indicaram a presença de compostos nitrosos. A atividade mutagênica na fase particulada variou de 1,2 a 7,8 rev/m³ para as áreas urbanas e esteve ausente nas amostras da área rural, e o

fracionamento químico do extrato orgânico demonstrou que a mutagenicidade direta estava associada a compostos polares característicos de emissões de tráfego, especialmente exaustão de diesel.

WATTS *et al.* (1988) determinaram a mutagenicidade (teste de Ames) e característica química do material particulado fino ($< 2,5 \mu\text{m}$) da área residencial de Juneau, Alaska, impactada pelas emissões da combustão de madeira, durante o inverno de 1985-86. A atividade mutagênica indireta (TA98 +S9) dos extratos orgânicos variou de 6,6 a 77,8 rev/m³ e, na ausência de fração microsomal foram detectados níveis mais baixos de atividade (2,7 a 57,5 rev/m³). Os autores observaram durante a maior parte do estudo uma correlação direta entre concentração de partículas finas, mutagenicidade indireta e concentrações de PAH.

De FLORA *et al.* (1989) testaram frações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), purificadas de extratos de material particulado de ar, coletado em Gênova, Itália, frente ao teste de Ames e mostraram que as frações de PAH contribuem somente para uma parte da atividade mutagênica total da amostra, apresentando uma atividade específica diferente do material não fracionado. O maior número de respostas positivas foi observado na linhagem TA100 na presença de S9 e, menos frequentemente, também na linhagem TA98 sem ativação metabólica. A potência de mutagenicidade das frações de PAH frente à linhagem TA100 (+S9) estava significativamente correlacionada com as concentrações individuais de PAHs na maioria das amostras analisadas.

LÖFROTH (1990), em estudo sobre a caracterização biológica e química de material particulado da área urbana de Gothenburg, Suécia, detectou diferenças na mutagenicidade, medida através do teste de Ames, das amostras coletadas ao nível da rua e aquelas coletadas a altitudes mais elevadas, indicando a ocorrência de transformações atmosféricas. O autor observou que 54% da resposta mutagênica detectada nas amostras de ar frente à linhagem TA98 na ausência de S9 era originada da emissão de diesel e 26% de gasolina. Na presença de S9 a contribuição entre as emissões de diesel (54%) e gasolina (47%) foram mais similares. Este autor também testou as amostras do material particulado de ar frente ao teste de Kado e observou uma sensibilidade de 4 a 8 vezes maior do que no teste de Ames.

MIGUEL *et al.* (1990) determinaram a atividade mutagênica de frações orgânicas (ciclohexano, acetona e diclorometano) de material particulado coletado no Rio de Janeiro, Brasil; Camden, New Jersey; e Caldecott Tunnel, Califórnia, frente ao teste de Ames. Os autores observaram maior atividade mutagênica específica frente à linhagem TA98 na ausência de fração S9, enquanto as frações obtidas em ciclohexano apresentaram maior mutagenicidade para a linhagem TA100 na presença de S9. Não foi observada uma diferença significativa nos índices de mutagenicidade diurnos e

noturnos para as amostras do Rio de Janeiro, exceto para as frações de acetona, que apresentaram valores mais elevados à noite na presença de ativação metabólica. A atividade mutagênica frente à linhagem TA98 foi maior no Rio de Janeiro (18 rev/m³) comparado com Camden (13 rev/m³), enquanto no túnel de Caldecott os níveis de mutagenicidade atingiram 44 rev/m³. Os autores avaliaram neste estudo também o Induteste e apontam a utilidade desse ensaio na triagem da genotoxicidade de material particulado de ar para posterior caracterização química.

VIRAS *et al.* (1990) estudaram a atividade mutagênica de 172 amostras de material particulado de ar coletadas de áreas urbanas e industriais de Atenas, durante o período de fevereiro de 1984 a janeiro de 1985, através do teste de Ames, frente à linhagem TA98 sem ativação metabólica. Todos os extratos orgânicos apresentaram atividade mutagênica direta, e a média anual dos índices de mutagenicidade foi de 1,9 revertentes/m³ (0,2 a 8,1 rev/m³), com os maiores valores registrados durante o inverno. As concentrações de benzo(a)pireno foram também determinadas e mostraram uma boa correlação com os índices de mutagenicidade, sendo que os maiores valores desses parâmetros foram observados nas áreas do centro da cidade e não nas áreas industriais.

FLESSEL *et al.* (1991) monitoraram, durante o período de 1984 a 1988 a mutagenicidade de extratos orgânicos (diclorometano e metanol/ultrassonicação) de material particulado de ar coletado na área da Baía de São Francisco (Concord, Richmond e Pittsburg), usando o teste de Ames (TA98). Os resultados obtidos nestes quatro anos de monitoramento mostraram sempre uma potencialização da resposta mutagênica na presença de ativação metabólica (-S9: 6 a 38 rev/m³; +S9: 7 a 63 rev/m³) e os índices de mutagenicidade e concentrações de benzo(a)pireno durante o inverno foram de 3 a 9 vezes mais altos que nas outras estações.

AGURELL & STENSTMAN (1992) em um estudo colaborativo do "International Programme on Chemical Safety (IPCS) para determinação de mutagenicidade de misturas complexas observou uma variação de sensibilidade de 3 a 37 vezes maior no ensaio de microssuspensão do que no ensaio convencional de incorporação em placa, dependendo do tipo de amostra, linhagem e condição metabólica, sendo que para as amostras de ar o fator de aumento foi de 3 a 9 vezes.

ADONIS & GIL (1993) empregaram o teste de Ames para determinar a atividade mutagênica de extratos orgânicos de material particulado de ar de Santiago, Chile e observaram altos índices de mutagenicidade (TA98), tanto na presença (309,7 rev/m³) como ausência de fração S9 (105,8 rev/m³), sugerindo que essas amostras contém tanto agentes mutagênicos indiretos (PAHs), como de ação direta. Os resultados obtidos com as *S. typhimurium* nitroredutase-deficientes (TA98NR e TA98/1,8/DNP6) indicaram a presença de mononitro- e dinitroarenos nos extratos orgânicos da atmosfera de

Santiago. Os autores sugerem que a presença de PAHs e nitroarenos nas partículas atmosféricas de Santiago, bem como os altos índices de mutagenicidade, representam um risco à saúde da população exposta.

ESPINOSA-AGUIRRE *et al.* (1993) analisaram extratos orgânicos (diclorometano) de material particulado da atmosfera da cidade do México, coletadas durante o verão e inverno de 1990, frente ao teste de Ames e os resultados detectados mostraram que as linhagens que possuem alta atividade para nitroredutase clássica (YG1021) e acetiltransferase (YG1024) foram as mais sensíveis, sugerindo que alguns compostos mutagênicos de ação direta presentes nessas amostras de ar urbano são nitroaromáticos. A resposta mutagênica foi maior para as amostras coletadas durante o inverno do que as de verão, e os autores atribuem essa diferença a condições atmosféricas que facilitariam a formação de nitrocompostos pela reação entre hidrocarbonetos aromáticos e óxidos de nitrogênio. Neste trabalho, os autores observaram que altas concentrações de extratos de "chili" causavam um efeito antimutagênico nos extratos de material particulado de ar.

SCARPATO *et al.* (1993) monitoraram, durante os anos de 1989 e 1990, a mutagenicidade de extratos orgânicos de partículas inaláveis, coletados na região nordeste da Itália em uma área rural na qual está instalada uma indústria química, usando o teste de Ames. Os resultados mostraram que a atividade mutagênica do material particulado atingiu os valores máximos durante os meses frios e não teve influência das emissões industriais. Análises de correlação entre mutagenicidade e número de veículos indicaram as emissões decorrentes do tráfego como a principal fonte de mutágenos.

LEE *et al.* (1994) observaram que a mutagenicidade de extratos orgânicos de amostras de material particulado de ar de Kaohsiung, Taiwan, medida através do teste de Ames (TA98), durante o período de agosto de 1990 a julho de 1991, apresentava uma correlação inversa com velocidade dos ventos e índices pluviométricos nesta região de clima tropical. As amostras coletadas em novembro de 1990 apresentaram os maiores índices de mutagenicidade, tanto na presença ($25,8 \text{ rev/m}^3$) como na ausência ($12,5 \text{ rev/m}^3$) da fração S9, sendo observada sempre uma maior resposta para os extratos testados com ativação metabólica. O fracionamento químico desses extratos mostrou os nitropirenos (1-nitropireno e dinitropirenos) como responsáveis pela mutagenicidade detectada nas amostras de ar, e os autores indicam as fontes móveis como a principal contribuição para a poluição atmosférica nesta área.

VELLOSI *et al.* (1994) investigaram, durante o ano de 1989, a presença de mutagenicidade na atmosfera de diferentes áreas de Pisa, Itália, com intensidade e características de tráfego distintas, através do teste de Ames (TA98 e TA100), e detectaram uma predominância de resposta a mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura. A atividade mutagênica foi mais elevada no inverno tanto na presença como na ausência de atividade metabólica. Os autores observaram uma potencialização significativa da mutagenicidade das amostras coletadas durante o segundo semestre, e sugerem que ocorrem variações nos tipos de mutágenos associados ao material particulado nos dois semestres. Trabalho similar realizado por BARALE *et al.* (1989) em Pisa sugere que as emissões de veículos são a principal fonte de mutágenos nesta cidade.

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL
BIBLIOTECA

CETESB

3.7. MATERIAL E MÉTODOS

3.7.1. AMOSTRAS

Foram utilizadas amostras de ar atmosférico procedentes da área urbana da Região Metropolitana de São Paulo e da área industrial de Cubatão.

3.7.1.1. Caracterização da área de estudo

As características da Região Metropolitana de São Paulo e Cubatão estão descritas detalhadamente no Relatório Anual de Qualidade do Ar de São Paulo (CETESB,1992) e resumidas abaixo:

3.7.1.2. Região Metropolitana de São Paulo

Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) está localizada geograficamente no Planalto Atlântico sob o Trópico de Capricórnio, a 80 km da costa, ocupando uma área de 8.000 km² caracterizada por elevações que chegam a atingir de 650 a 1200 m de altitude acima do nível do mar. A região urbana, conhecida como Planalto Paulista, tem uma área de 5000 km², com altitude variando entre 715 a 900 m. A topografia em geral é bastante complexa e o fluxo de ar é fortemente influenciado pelas condições locais. O clima na RMSP pode ser considerado como seco no inverno e úmido no verão. Situada entre os maiores conglomerados humanos do mundo, com uma população de aproximadamente 17 milhões de habitantes e uma frota de veículos estimada em 4 milhões, além de um grande número de indústrias pesadas (siderúrgicas e aciarias, fábricas de cimento, ácido sulfúrico, fertilizantes, refinarias e indústrias petroquímicas, químicas, etc), a RMSP tem apresentado altos níveis de poluição atmosférica há vários anos, principalmente durante o inverno.

3.7.1.3. Área de Cubatão

O Município de Cubatão está localizado no litoral, a cerca de 44 km da cidade de São Paulo, com uma área de 162 km² contornada por colinas e montanhas em forma de U, cobertas por uma floresta tropical classificada como Atlântica Úmida, que alcançam altitudes de 700 a 1000 m acima do nível do mar. Com uma população de aproximadamente 98.700 habitantes, Cubatão apresenta uma localização e topografia

geral bastante complexas, com uma distribuição muito irregular de centros industriais e habitacionais. O complexo industrial instalado no município congrega grande número e diversidade de instalações industriais, como uma siderúrgica, várias fábricas de fertilizantes e diversas indústrias químicas e petroquímicas, entre outras. A qualidade do ar em Cubatão é determinada quase que exclusivamente por essas fontes industriais, que conferem concentrações extremamente altas de partículas em suspensão, principalmente na Vila Parisi, caracterizando dessa forma um problema totalmente diferente da RMSP, onde os poluentes relacionados a veículos automotores contribuem significativamente para a poluição atmosférica. Estudos realizados na área mostraram ser decisiva a participação do grupo de indústrias de fertilizantes na formação do material particulado na atmosfera local.

3.7.1.4. Pontos de amostragem

Os locais de coleta foram selecionados com base nos dados históricos do Monitoramento de Qualidade do Ar do Estado de São Paulo realizado pela Divisão de Qualidade de Ar (EQQ/EQ/E) da CETESB. Foram escolhidos três pontos de amostragem levando-se em consideração a presença de fontes poluidoras de origem urbana e industrial.

PDP: Parque D. Pedro II, 319 - Centro, São Paulo (Vale do Rio Tamanduateí). Estação de amostragem próxima a um terminal de ônibus urbanos e corredores de tráfego intenso (Fig.1). A poluição neste local deve-se principalmente à emissão de veículos automotores e à poeira das ruas, responsáveis por respectivamente 38% e 45% das partículas totais em suspensão (ALONSO *et al.*, 1992).

PIN: Pinheiros, Av. Prof. Frederico Hermann Junior, 345 - Pinheiros, São Paulo. Estação de amostragem localizada no interior das instalações da CETESB, em área predominantemente residencial, na região oeste da cidade, a 300 metros da Marginal do Rio Pinheiros (Fig.2).

CP: Vila Parisi, Rua Prefeito Armando Cunha, 65, Cubatão. Estação de amostragem situada na E. E. 1º Grau Estado da Bahia, em área residencial dentro do Parque Industrial (Fig.3). A poluição neste local deve-se quase que exclusivamente a fontes industriais, e os principais responsáveis pelas partículas totais em suspensão são o sulfato de amônia (14,8%), o cimento (19,4%) e a poeira de rua (MARTINS *et al.*, 1993).

3.7.2. COLETA DE AMOSTRAS

As amostras de material particulado de ar em suspensão foram coletadas em filtros de fibra de vidro Gelman A/E usando amostradores de ar HI-VOL (Sierra Andersen) (Fig. 4) por um período de 24 h e vazão média de 1,43 m³/min. As amostragens foram realizadas semanalmente durante o período de um ano (junho 1990 a maio 1991) pelo Setor de Amostragem e Análise do Ar (EQQA) da CETESB, dentro do Programa de Monitoramento da Qualidade do Ar. Os filtros foram pesados antes e depois da amostragem, após equilíbrio a 45% de umidade, para cálculo das partículas totais em suspensão (PTS). Os filtros foram armazenados à temperatura ambiente em papel alumínio e papel kraft.

3.7.3. EXTRAÇÃO ORGÂNICA DE MATERIAL PARTICULADO DE AR

As amostras de material particulado de ar são quimicamente muito complexas, contendo centenas de compostos orgânicos, muitos deles em concentrações extremamente pequenas. Geralmente, a fração orgânica do material particulado é separada da porção inorgânica através de um solvente orgânico usando o métodos de soxhlet ou por ultrassonicação.

KREWSKI *et al.* (1992) em um estudo interlaboratorial do "International Programme on Chemical Safety", sobre fontes de variações na potência de mutagenicidade de misturas químicas complexas avaliadas frente ao teste de Ames, observou que não houve diferença significativa na potência dos resultados obtidos pelos laboratórios que usaram soxhlet e os que utilizaram ultrassonicação, embora tenha sido detectada uma maior variação interlaboratorial para o método de soxhlet.

Uma variedade de solventes tem sido utilizados nesses processos de extração, sejam puros, em misturas, ou em série (KRISHNA *et al.*, 1983; LEE *et al.*, 1991; NIELSEN, 1992; VIAU *et al.*, 1982). Entretanto, o cloreto de metileno (DCM), usado sozinho, ou seguido por metanol ou acetona, tem sido um dos solventes mais comumente usados para extração de material orgânico de ar (MAY *et al.*, 1992; NIELSEN, 1992). Dados compilados da literatura demonstram que o DCM extrai 4,4 a 6,0% da massa do material particulado de ar. Uma segunda extração usando metanol resulta na recuperação de material adicional incluindo compostos orgânicos mais polares (ex. ácidos orgânicos) e sais inorgânicos (ex. sulfato de amônio) (CLAXTON *et al.*, 1992; LEWTAS *et al.*, 1990; MAY *et al.*, 1992)

Os compostos orgânicos adsorvidos ao material particulado de ar foram extraídos pelo método de ultrasonicação de acordo com PITTS *et al.* (1982) e COURTOIS *et al.* (1985), usando-se diclorometano (DCM, Merck) na proporção de 1 mL de solvente para cada mg de PTS.

As amostras denominadas "pool" foram obtidas através de um processo único de extração orgânica, combinando um quarto de todos os filtros individuais amostrados em cada estação do ano (13 filtros em média) a saber: inverno (junho, julho, agosto); primavera (setembro, outubro, novembro); verão (dezembro, janeiro, fevereiro) e outono (março, abril, maio). Para cada estação de amostragem foram selecionadas, mensalmente, as amostras com maior concentração de PTS e extratos orgânicos individuais foram também preparados a partir de um quarto dos filtros.

As amostras foram ultrasonificadas (900 W, 25 Hz), por três vezes, em volumes previamente calculados de DCM, durante 10 minutos, a temperatura aproximada de 25°C. O extrato obtido foi filtrado em membrana de teflon (Fluopore, Millipore) de 0,5 µm de porosidade e posteriormente concentrado em evaporador rotatório a vácuo à temperatura de 37°C até o volume de 10 mL. Os extratos foram armazenados em congelador a -20°C e, no momento dos ensaios de mutagenicidade, volumes apropriados do extrato foram evaporados em atmosfera de nitrogênio gasoso e ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) de forma a se obter as doses desejadas para teste.

A quantidade de material orgânico extraído (MOE) em mg/mL presente em cada amostra foi determinada em balança eletrônica (Mettler). Volumes de 1 mL dos extratos obtidos em DCM foram pipetados em duplicata em cadinhos de alumínio previamente secos (104 °C) e de pesos determinados. Após a completa evaporação do solvente à temperatura ambiente e em dessecador por 16 horas, pesou-se novamente os cadinhos, e calculou-se a concentração de MOE pela média das diferenças dos pesos iniciais e finais para cada amostra. A concentração de MOE em µg/m³ foi determinada conhecendo a quantidade total de MOE por filtro e o volume total de ar amostrado.

3.7.4. ENSAIOS DE MUTAÇÃO GÊNICA REVERSA

Os ensaios de mutação gênica reversa avaliados neste trabalho foram o teste de Ames e teste de Kado. Ambos ensaios baseiam-se na utilização de linhagens de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para o aminoácido histidina, as quais reverterem à prototrofia pelo tratamento com agentes mutagênicos (AMES *et al.*, 1973; MARON & AMES, 1983).

3.7.4.1. Linhagens de *Salmonella typhimurium*

Foram utilizadas as linhagens de *S. typhimurium* TA97a, TA98, TA100, TA104, TA98NR e TA98/1,8DNP₆, fornecidas pelo Dr. Bruce N. Ames (Universidade de Berkeley, California, USA) e Dra. Virginia S. Houk (U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, USA). Essas linhagens apresentam diferentes mutações no operon da histidina e outras características genéticas que lhes conferem maior sensibilidade na detecção de diversos mutágenos tais como: mutação *rfa* que causa perda parcial da barreira lipopolissacarídica da parede bacteriana facilitando a difusão de moléculas grandes para o interior da célula; deleção do gene *uvrB* que causa deficiência do sistema de reparo por excisão e o plasmídeo pKM101 que além de conferir resistência à ampicilina, contém os genes *muc* AB, cuja expressão causa estímulo no sistema de reparo susceptível ao erro ("error prone") (Tabela 1).

As linhagens TA97a e TA98 detectam mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA e as linhagens TA100 e TA104 detectam mutágenos que causam substituição de pares de bases.

As linhagens TA98NR e TA98/1,8DNP₆ apresentam as mesmas características genéticas que a TA98 mas, ao contrário desta, são deficientes para nitroredutases. Essas linhagens são de importância na detecção de nitroarenos e outros nitrocompostos cancerígenos, cuja mutagenicidade é potencializada pela ação das nitroredutases bacterianas. A linhagem TA98NR é resistente a 1-nitropireno (deficiente em nitroredutases) e a TA98/1,8DNP₆ é resistente a 1,6-DNP e 1,8-DNP (deficiente em nitroredutase e *O*-acetiltransferase) (McCOY *et al.*, 1983).

Portanto, uma redução da resposta mutagênica frente a linhagem nitroredutase deficiente em relação a linhagem parental indica a presença de nitrocomposto na amostra.

Para o teste de Ames foram utilizadas as linhagens TA98, TA100, TA98NR e TA98/1,8DNP₆ e para o teste de Kado as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA104.

3.7.4.2. Sistema de ativação metabólica

Um aspecto importante dos ensaios bacterianos *in vitro* é a inclusão de um sistema de ativação metabólica (homogeneizado de fígado de mamíferos) para a detecção de promutágenos ou mutágenos indiretos. Esses compostos não têm ação *per se* sobre o DNA, mas após serem biotransformados no organismo, em especial de mamíferos, são convertidos em compostos altamente reativos com o DNA. Essas reações de metabolização (hidroxilação, dealquilação, sulfoxidação, oxidação, desulfuração,

dehalogenação) são dependentes de monooxigenases, conhecidas como citocromos p450 e p448, que se localizam nos microssomos e membrana nuclear das células de vários tecidos do corpo. Estudos têm demonstrado que o fígado é o órgão mais rico nessas enzimas e os roedores são os mamíferos que têm maior atividade das mesmas, sendo o homogeneizado microssomal de células de fígado de rato, previamente tratado com agente indutor, o sistema de ativação metabólica mais comumente utilizado em ensaios com microrganismos procariotos (KAPPAS & ALVARES, 1975; WRIGHT, 1980). Como exemplo de promutágenos, entre os poluentes atmosféricos podemos citar o benzo(a)pireno, o benzo(a)antraceno e os hidrocarbonetos policíclicos em geral.

Os testes de mutagenicidade foram realizados em presença e ausência de ativação metabólica. O sistema utilizado foi a fração microssomal S9 (S9 mix) preparada a partir de homogeneizados de fígado de ratos Sprague Dawley, previamente tratados com Aroclor 1254, adquiridos liofilizados da MolTox Molecular Toxicology Inc., Annapolis, USA.

Volumes adequados da mistura de ativação, S9, foram preparados no momento do ensaio e mantidos em gelo durante sua execução. Após o ensaio, a mistura não utilizada era descartada. Utilizou-se a mistura preparada de acordo com MARON & AMES (1983).

3.7.4.3. Procedimento do teste de Ames (*Salmonella*/mammalian micrososome mutagenicity test)

O método utilizado foi o de incorporação em placas descrito por MARON & AMES (1983) e CETESB (1993).

Volumes de 100 µL do extrato orgânico, na concentração correspondente a cada dose, foram adicionados, em duplicata, a tubos contendo 3 mL de ágar de superfície, previamente fundido e mantido a 45°C. A seguir, foram adicionados 100 µL da cultura bacteriana e 500 µl de mistura S9 para os ensaios com ativação metabólica. Após homogeneização, o conteúdo dos tubos foi vertido em placas de ágar mínimo, as quais foram incubadas por 66 h a 37°C. A contagem do número de colônias revertentes foi realizada em contador automático tipo Biotran II (New Brunswick, USA).

Para cada amostra foram testadas 6 doses diferentes de extrato orgânico, previamente determinadas, sendo que a dose máxima de exposição foi de 400 µg de extrato por placa.

3.7.4.4. Procedimento do teste de Kado - Ensaio de micro suspensão com *S. typhimurium*

Este ensaio é uma modificação do método de pré-incubação do teste de Ames, baseada no aumento da concentração de bactérias e decréscimo da quantidade de amostra a ser testada, aplicado principalmente na avaliação da atividade mutagênica de extratos orgânicos onde a massa ou volume de material disponível é pequeno (KADO *et al.*, 1983). O método utilizado foi o descrito por KADO *et al.* (1986) e modificado por DeMARINI *et al.* (1989) (CETESB, 1991a).

Volumes de 2 µL de extrato orgânico, na concentração correspondente a cada dose, foram incubados por 90 minutos a 37°C com 50 µL da cultura bacteriana e 50 µL de mistura S9 ou 50 µL de tampão fosfato diluído (1:13), quando o ensaio foi realizado sem ativação metabólica. A seguir, adicionou-se a cada tubo, 2 mL de ágar de superfície previamente estabilizado a 45°C e após homogeneização, verteu-se o conteúdo em placas de ágar mínimo. Após incubação por 66 horas a 37 °C, procedeu-se à contagem das colônias revertentes em contador automático (Biotran II). Os testes foram realizados em duplicata e as doses testadas foram de: 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 µg de extrato orgânico por placa.

3.7.4.5. Controles

Paralelamente a cada ensaio, foram realizados controles negativo e positivo, bem como controle de toxicidade do extrato orgânico e viabilidade das culturas bacterianas.

O controle negativo empregado nesses ensaios foi sempre o DMSO, no volume de 100 µL para o teste de Ames e 2 µL para o teste de Kado.

Os controles positivos incluíram compostos mutagênicos específicos para cada linhagem e condição do ensaio, sendo empregadas as seguintes concentrações por placa: 0,5 µg de 4-óxido-1-nitroquinolina (4NQO) para as linhagens TA97a, TA98 e TA104 e 5,0 µg de azida sódica para TA100, em ensaios sem fração S9; 2,5 µg de 2-aminoantraceno para todas as linhagens em ensaios com ativação metabólica; e 10,0 µg de 2-nitrofluoreno para as linhagens nitroredutases deficientes, TA98NR e TA98/1,8DNP₆.

A toxicidade das amostras foi verificada através do exame da presença de crescimento de fundo ("background") nas placas teste de ágar mínimo.

A viabilidade das culturas bacterianas utilizadas nos testes foi avaliada através do plaqueamento de diluições 10^{-7} (teste de Ames) e 10^{-9} (teste de Kado) das culturas teste em ágar nutriente. Após 24 h de incubação a 37°C , o número de colônias foi registrado e a densidade de bactérias calculada, multiplicando o número de colônias pelo fator de diluição.

3.7.4.6. Avaliação e interpretação dos resultados

Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico "Salmonel" elaborado e gentilmente cedido pelo Dr. L. Myers do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA. Este programa permite avaliar o efeito dose resposta através do cálculo da análise de variância (ANOVA - teste F) entre as médias do número de revertentes nas diferentes doses testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. O modelo do programa escolhido para análise dos dados foi o modelo Bernstein (BERNSTEIN *et al.*, 1982). A inclinação da reta da parte linear da curva dose-resposta é também fornecida por esse programa e corresponde ao número de revertentes induzidos por μg de extrato orgânico analisado.

A partir dos resultados obtidos, calculou-se ainda a razão de mutagenicidade (RM) para cada dose analisada, que é a média do número de revertentes na placa teste (espontâneos mais induzidos) dividida pela média do número de revertentes por placa do controle negativo (espontâneos).

Considerou-se uma amostra positiva quando a razão de mutagenicidade (RM) foi maior ou igual a 2 em pelo menos uma das doses testadas e houve uma relação dose-resposta estatisticamente significativa entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos. Quando somente um dos critérios foi atingido, considerou-se que a amostra apresentou indícios de mutagenicidade (McGEORGE *et al.*, 1985; VALENT *et al.*, 1993; VARGAS *et al.*, 1993).

Os resultados foram expressos em revertentes/ μg de MOE e revertentes/ m^3 de volume de ar, calculado a partir do número de revertentes/ μg e concentração de MOE por m^3 . Para comparação dos diferentes ensaios os resultados foram expressos em CME (concentração mínima efetiva) em μg , que corresponde à menor dose da amostra, calculada a partir da equação da reta de regressão, para qual se obtém o dobro do número de revertentes em relação ao controle negativo (BRUSICK & YOUNG, 1981).

3.7.5. ENSAIO DE MUTAÇÃO DIRETA

O ensaio de mutação direta avaliado neste estudo foi o teste de microssuspensão com *S. typhimurium* TM677 usando a 8-azaguanina como agente seletivo. Este ensaio baseia-se na utilização de linhagens de *S. typhimurium* TM677 sensíveis a 8-azaguanina, as quais desenvolvem resistência a essa droga pela ação de agentes mutagênicos (SKOPEK *et al.*, 1978a, b). O termo "micro" refere-se a uma redução de 10 vezes no volume da amostra a ser testada, em relação ao ensaio padrão, o que torna este teste bastante útil também na avaliação de mutagenicidade de amostras com volume limitado para teste.

3.7.5.1. Princípio e procedimento do ensaio (Microforward mutation assay in *Salmonella typhimurium*)

A linhagem de *S. typhimurium* TM677 usada neste estudo foi cedida pelo Dr. Larry D. Claxton da U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, Carolina do Norte, USA. Esta linhagem é um derivado isogênico da linhagem TM35 (revertente espontâneo da *S. typhimurium* TA1535 prototrófico para histidina) que carrega o plasmídeo pKM101 (fator R) transferido da linhagem TA2000 por conjugação (SKOPEK *et al.*, 1978b). Além do plasmídeo pKM101, essa linhagem apresenta mutação *rfa*, deleção do gene *uvrB* e um sistema de seleção simples para detecção de mutação direta baseado na capacidade de mutantes crescerem na presença de 8-azaguanina (8-AG). A 8-AG, um análogo de base purina, que ao ser metabolizado e incorporado nos ácidos nucleicos, exercem efeito tóxico à célula bacteriana. Essa resistência está relacionada à mutação do gene estrutural *gpt* (e possivelmente genes reguladores) que codifica para a enzima xantina fosforibosiltransferase, responsável pelo transporte e fosforilação da 8-AG na membrana celular. Portanto, a perda da enzima não permitirá a entrada da 8-AG na célula bacteriana., tornando-a resistente a esse composto.

A metodologia utilizada foi a descrita por SKOPEK *et al.* (1978a, b) e modificada por LEWTAS *et al.* (1987). Alíquota de 1 mL da cultura de TM677 mantida no freezer foi rapidamente descongelada em banho-maria a 42°C e inoculada em 10 mL de meio mínimo líquido (37°C). Após incubação por 3 h a 37°C sob agitação (185-200 rpm), 1 mL da cultura foi adicionado a 9mL de meio mínimo líquido, de forma a se obter uma concentração de $\sim 2 \times 10^7$ células/mL (DO 420 nm = 0.11-0.12) para uso no ensaio.

Volumes de 2 µL de extrato orgânico, na concentração correspondente a cada dose, foram incubados a 37°C sob agitação (125 rpm) com 98 µL de uma mistura composta de cultura bacteriana e fração S9, preparada de acordo com LEWTAS *et al.* (1987). Nos ensaios realizados sem ativação metabólica, a mistura foi composta de cultura e de meio mínimo líquido.

Após pré-incubação por uma hora, alíquotas de 0,1 mL da mistura foram adicionadas a 10 mL de ágar de superfície estabilizado a 45°C contendo 0,2 mL de solução de 8-AG (20 mg/mL em DMSO) para seleção dos mutantes. Após uma diluição dessa mistura em tampão fosfato, volumes de 100 µL foram adicionados a 10 mL de ágar de superfície não seletivo (sem 8-AG) para determinação das células sobreviventes. Três alíquotas, de 2,5 mL cada, dos dois tratamentos (mutantes e sobreviventes), foram plaqueadas em ágar mínimo. Aproximadamente 1×10^6 e 400 células foram plaqueadas nos tratamentos, mutagenicidade e sobrevivência, respectivamente. As placas foram incubadas invertidas a 37°C por 48 h e o número de colônias mutantes e sobreviventes foi determinado em contador automático. As doses testadas nesse ensaio foram: 12,5; 25,0; 50,0 e 100,0 µg.

Como controle negativo foi utilizado o solvente DMSO, e os controles positivos empregados foram benzo(a)pireno (1µg/tubo) e 4NQO (0,5 µg/tubo) para os ensaios com e sem atividade metabólica, respectivamente.

3.7.5.2. Avaliação e interpretação dos resultados

A frequência de mutantes (FM) para cada dose foi calculada dividindo-se a média do número de colônias mutantes (3 placas M) pela média do número de colônias sobreviventes (3 placas T) e multiplicando-se pelo fator de diluição (1×10^{-4}). Os resultados foram expressos como frequência de mutantes por 10^5 sobreviventes. A frequência de mutantes induzidos por µg de MOE ou m^3 de ar foi calculada a partir da inclinação da reta obtida através da regressão linear entre as doses expressas tanto em µg como em m^3 . Para comparação com os ensaios de mutação reversa, os resultados foram expressos em CME em µg de MOE ou m^3 .

A razão de mutagenicidade para cada dose analisada foi calculada dividindo-se a média de colônias mutantes na placa teste pela média de colônias mutantes (induzidas mais espontâneas) na placa controle (espontâneas).

Os critérios utilizados para determinar a positividade da amostra foram os mesmos dos testes de mutação reversa. Considerou-se uma amostra positiva quando a razão de mutagenicidade foi maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas e houve uma relação dose-resposta entre as concentrações testadas e frequência de mutantes. Quando somente um dos critérios foi atingido, considerou-se que a amostra apresentou indícios de mutagenicidade.

3.7.6. ENSAIOS BASEADOS NA FUNÇÃO SOS

Os ensaios baseados na função SOS avaliados neste trabalho foram o SOS Cromoteste e o Induteste. Ambos baseiam-se na indução do sistema de reparo SOS em consequência de lesões causadas no DNA por agentes genotóxicos. Estes testes são capazes de detectar diferentes classes de agentes genotóxicos tais como: metais, agentes neoplásicos, agentes inibidores da síntese do DNA, agentes que causam quebras no DNA, bem como mutágenos que causam mutações de ponto.

3.7.6.1. SOS Cromoteste

3.7.6.1.1. Princípio e procedimento do ensaio

O Cromoteste é um ensaio colorimétrico baseado na avaliação quantitativa de uma das funções do sistema de reparo SOS, a filamentação bacteriana, que é controlada pelo genes *sfi*.

Utiliza a linhagem PQ37 desenvolvida por QUILLARDET *et al.* (1982), derivada da *E. coli* K12. Possui uma fusão dos operons *sfiA::lacZ*, de forma que a produção de β -galactosidase (expressão do gene *lacZ*) está na dependência da indução do operador *sfiA*, ou seja, será produzida quando o sistema de reparo SOS for ativado. Além disso, a linhagem tem a mutação *uvrA*, a mutação *rfa* e apresenta resistência à ampicilina (ver item 3.7.4.1).

O princípio do método baseia-se na mistura da linhagem PQ37 com a amostra teste e, após um período de incubação de 2 horas, mede-se a quantidade de β -galactosidase produzida, utilizando-se X-gal ou ONPG como substrato da enzima (QUILLARDET & HOFNUNG, 1985).

A intensidade da cor azul (X-gal) ou amarela (ONPG) é proporcional a quantidade de β -galactosidase produzida, que por sua vez é proporcional a extensão dos danos causados pelos agentes genotóxicos.

A toxicidade da amostra é avaliada através da medida da enzima fosfatase alcalina, constitutiva na linhagem PQ37 (mutação *phoC*). A avaliação da toxicidade é importante, pois caso a amostra seja tóxica, ambas enzimas (β -galactosidase e fosfatase alcalina) não serão produzidas ou serão produzidas em quantidades menores, evitando-se assim a interpretação dos dados como um resultado falso-negativo.

O Cromoteste foi realizado em microplaca de 96 orifícios utilizando-se o kit desenvolvido pela Orgenics Co., Israel segundo as especificações do fabricante (ORGENICS, 1988).

Todos os extratos dos "pools", dissolvidos previamente em DMSO (ver item 3.7.3), proveniente das estações de PDP, PIN e os extratos de CP de primavera e inverno foram testados nas doses de 5; 10; 20; 40; 60; 80 e 100 μg de MOE, por orifício e, para os "pools" de CP de outono e verão foram utilizadas as doses 2,5; 5; 10; 20; 30; 40 e 50 μg de MOE por orifício. O volume utilizado por orifício foi sempre de 2 μL .

Todos os ensaios foram realizados em duplicata (2 orifícios/dose) utilizando-se 2 μL de volume para todas as doses testadas.

Foram empregados controles positivos e negativos em paralelo a cada teste. Os controles positivos utilizados foram a 4 nitroquinoleína-1-óxido (4NQO), nas doses 12,5; 25; 50 e 100 ng, sem S9 e o 2 aminoantraceno (2 AA), nas doses 125; 250; 500 e 1000 ng, com S9, ambos fornecidos pelo fabricante do kit. O controle negativo empregado foi 2 μL do solvente (DMSO).

A leitura dos ensaios foi realizada em espectrofotômetro Uniskan II (Labsystem).

3.7.6.1.2. Avaliação e interpretação dos resultados

Após o cálculo da média da leitura de absorbância obtida para cada dose, para as duas enzimas (β -galactosidase e fosfatase alcalina), foi feito o cálculo das unidades enzimáticas segundo MILLER (1972).

Em seguida, foi calculada a razão (r) entre as duas enzimas, dividindo-se os valores das unidades enzimáticas de β -galactosidase (UE β -gal) pelas de fosfatase alcalina (UE FA).

Foi calculado o fator de indução (FI), tomando-se o valor de (r) de cada dose e dividindo-o pelo valor de (r) do controle negativo. Com os valores de FI foi realizada uma análise de regressão linear, sendo a inclinação da reta obtida denominada SOSIP (onde o valor SOSIP indica a potência da amostra em teste), tanto expresso em μg de MOE como em m^3 de ar.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram relação dose-resposta, estatisticamente significativa e/ou FI > 2 em uma ou mais doses testadas.

3.7.6.2. Induteste

3.7.6.2.1. Princípio e procedimento

A indução do profago λ em bactérias lisogênicas constitui uma das funções do reparo SOS, sendo explicada pela clivagem do repressor (CI) do fago, pela atividade proteica da proteína *recA*. Desta forma a indução do profago passa a ser uma indicação indireta da ocorrência de uma lesão no DNA. e serve portanto, como indicação da ocorrência de uma lesão no DNA.

A metodologia utilizada neste ensaio foi a descrita por DeMARINI *et al.* (1990). Foram utilizadas as linhagens *E. coli* WP2 λ (*lon11*, *sulA1*, *trpE34*, *uvrA155*, *lambB⁺*) derivada da *E. coli* B/r e TH-008 (estreptomicina^R) derivada da *E. coli* C. A primeira é uma linhagem lisogênica e a segunda é sensível à atividade lítica do fago.

Uma cultura em fase log de *E. coli* WP2 λ foi incubada com diluições seriadas (1:2) do extrato de cada "pool" em meio mínimo (suplementado com glicose e triptofano), na presença e ausência de ativação metabólica - mistura S9 (fração S9 1%, v/v), por 20 horas a 37° em microplacas de 96 orifícios.

Do extrato de cada "pool" foram testadas 8 diluições, sendo a dose máxima de exposição 500 μ g de MOE/ensaio (20 μ L) seguida de diluições 1:2 na microplaca até a dose de 3,91 μ g de MOE.

A acetona foi utilizada como solvente dos extratos orgânicos e portanto também como controle negativo em porcentagens iguais às empregadas nas amostras. A porcentagem máxima de solvente utilizado foi de 6,7%, diluindo-se 1:2 até 0,05% de acetona por ensaio.

Foram realizados controle positivos utilizando-se 4-nitroquinoleína-1-óxido sem fração S9 e 2-amino-antraceno com S9. Várias doses desses compostos químicos foram utilizadas (curvas dose-resposta) empregando-se como dose máxima 2 μ g/ensaio e como dose mínima 0,06 μ g.

Após o período de incubação, 100 μ L de uma diluição 1:50 de cada orifício foram adicionados a 200 μ L de cultura em fase log da linhagem indicadora (*E. coli* TH-008) devidamente diluída (1:50) em tubos contendo 3 mL de agar de superfície pré-fundido, mantidos a 45°C, e vertido em placas de agar triptona contendo estreptomicina para seleção contra a linhagem lisogênica. Esse procedimento foi feito em triplicata, para

cada uma das doses testadas.. As placas foram incubadas a 37°C e as placas de lise foram contadas em contador manual tipo Quebec.

3.7.6.2.2. Avaliação e interpretação dos resultados

Para cada dose calculou-se a média de UFP/placa (unidade formadora de placas de lise por placa de Petri). A seguir foi calculada a razão de indução (RI), que é a razão entre o número de UFP/placa em cada dose de amostra testada pela UFP/placa do controle negativo. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram $RI > 4$ pelo menos em uma das doses testadas.

Tomando-se as doses empregadas da amostra em μg de MOE e as médias das UFP/placa respectivas, foi realizada uma análise de regressão linear, onde o valor correspondente a inclinação da reta obtida indica a potência mutagênica de cada "pool" testado. Esta potência é então expressa em UFP/ μg de MOE. Quando possível foi também calculado o CME de cada amostra.

3.7.7. ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS

Os parâmetros químicos: dióxido de enxofre (SO_2), dióxido de nitrogênio (NO_2), ozônio (O_3), foram obtidos através das medições da rede automática do Setor de Telemetria (EQQT) da CETESB. Os dados são enviados a uma estação central através de linhas telefônicas privadas (estações fixas), onde são processadas com auxílio de um computador. Os métodos utilizados na determinação desses parâmetros pela rede automática são: poeira em suspensão - Monitor beta; SO_2 - Coulometria; óxidos de nitrogênio e ozônio - Quimioluminescência. Os dados de temperatura, umidade e índices pluviométricos para a cidade de São Paulo e Cubatão foram fornecidos pelo Setor de Meteorologia (EQQM) da CETESB.

3.8. RESULTADOS

3.8.1. INDICADORES DE QUALIDADE DO AR

Os valores médios das concentrações de dióxido de enxofre (SO₂) e partículas totais em suspensão (PTS), durante o período de junho de 1990 a maio de 1991, na atmosfera de São Paulo e Cubatão, estão reunidos na Fig. 5. Os dados para ozônio (O₃) e dióxido de nitrogênio (NO₂) para o Parque D. Pedro (PDP) são também apresentados na Fig. 5.

As concentrações médias de SO₂ estiveram, praticamente, durante todo o período de estudo, abaixo de 30 µg/m³ (2 a 44 µg/m³), com as menores médias sendo registradas em Cubatão. Os índices anuais de SO₂, estiveram bem abaixo do padrão nacional (80 µg/m³).

Os índices de PTS em Vila Parisi estiveram acima de 200 µg/m³ na maioria dos meses, com uma média anual de 188 µg/m³, a qual está muito acima da média anual de 80 µg/m³ permitida pela Legislação Brasileira. No Parque D. Pedro, os maiores valores médios de material particulado em suspensão foram observados no período de junho a agosto de 1990 (232 a 297 µg/m³), sendo a média anual de 134 µg/m³, não atendendo os padrões nacionais para qualidade do ar.

As menores concentrações de PTS foram observadas na estação de Pinheiros, com a maior média no mês de agosto e uma média anual de 72 µg/m³.

As concentrações de NO₂ no Parque D. Pedro não apresentaram variações significativas durante o ano de estudo, com valores oscilando ao redor de 100 µg/m³ e uma média anual de 89 µg/m³, muito próxima do limite de 100 µg/m³ permitido pela Legislação Brasileira. Os dados de ozônio foram também bastante variáveis e mostraram uma maior concentração média desse poluente nos meses de novembro a fevereiro (21 a 36 µg/m³), período de maior incidência de luz solar na atmosfera.

3.8.2. CONDIÇÕES CLIMÁTICAS

As Tabelas 2 e 3 mostram os dados relativos à temperatura, umidade do ar e precipitação pluviométrica das Cidades de São Paulo e Cubatão durante o período de junho de 1990 a maio de 1991. Em São Paulo, a temperatura média variou de 14,7°C a 22,8°C e a umidade relativa do ar de 72,2 a 84,6%. Os índices de precipitação pluviométrica oscilaram

entre 34,2 mm (maio 1991) e 451,3 mm (março 1991). Na cidade de Cubatão foram registradas temperaturas entre 17,9°C a 25,7°C com uma umidade relativa variando de 74,9% a 90,8%. A precipitação pluviométrica foi mais intensa também no mês de março de 1991 (564,7 mm), e o mês mais seco foi o de dezembro de 1990 (53,4 mm).

3.8.3. PARTÍCULAS TOTAIS EM SUSPENSÃO (PTS) E MATERIAL ORGÂNICO EXTRAÍDO (MOE)

A concentração de material particulado variou de acordo com o ponto de coleta e o período de estudo, sendo muitas vezes observadas diferenças significativas de PTS entre duas coletas consecutivas de material particulado.

A Tabela 4 mostra a média de volume de ar amostrado e de PTS, bem como a concentração e porcentagem de material orgânico extraído (MOE) para os "pools" das quatro estações do ano. No Parque D. Pedro as concentrações de PTS e MOE variaram de 104,9 a 272,0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e de 14,5 a 8,7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, respectivamente, sendo que os maiores índices foram registrados no inverno e primavera. Entretanto, a maior porcentagem de MOE foi obtida durante o verão (9,3%).

Os "pools" das amostras da estação de Pinheiros foram os que apresentaram os menores níveis de PTS (58,6 a 92,7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), embora fossem as amostras com as maiores porcentagens de MOE. Os valores de MOE para esta estação variaram de 11,0 a 3,8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Em Vila Parisi os valores de PTS mantiveram-se elevados durante as quatro estações (190,2 a 221,4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), embora um ligeiro aumento fosse observado durante o inverno e primavera, igualmente às outras duas áreas estudadas. A concentração e porcentagem de material orgânico extraído foi relativamente baixa e não apresentou variação significativa durante o período de estudo.

A Tabela 5 resume as concentrações de partículas totais em suspensão (PTS) e material orgânico extraído (MOE) para as amostras de ar que apresentaram o maior valor mensal de PTS e foram denominadas amostras "H".

A atmosfera do Parque D. Pedro (PDP) apresentou os maiores índices de PTS e MOE no período de junho a outubro de 1990, chegando a atingir 637 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de PTS e 54,4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de MOE no mês de agosto de 1990. Entretanto, a porcentagem de MOE não apresentou variações significativas durante o período de estudo (6,1% a 9,7%).

Em Pinheiros, apesar dos índices de PTS estarem praticamente abaixo de $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para a maioria das amostras, as concentrações de MOE foram bastante elevadas, chegando a atingir valores de $25,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ no mês de junho. As amostras que apresentaram maior porcentagem de material orgânico foram as coletadas em fevereiro de 1991 (17,8%) e junho de 1990 (14,7%), respectivamente.

Assim como para os "pools", as amostras "H" de Cubatão apresentaram índices elevados de PTS durante o ano de estudo. As concentrações de MOE foram variáveis, atingindo índices de até $13,8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ no mês de agosto. As porcentagens de MOE variaram entre 1,4 % e 3,2% durante o período de estudo.

3.8.4. TESTE DE AMES

3.8.4.1. Extratos orgânicos dos pools sazonais de material particulado de ar

3.8.4.1.1. Atividade mutagênica para as linhagens de *S. typhimurium* TA98 e TA100

Todos os extratos orgânicos analisados foram capazes de induzir resposta mutagênica nas linhagens TA98 e TA100 na presença e ausência de ativação metabólica, exceto a amostra de outono de Cubatão que foi negativa para a TA100 na ausência de atividade metabólica. Esses resultados indicam a presença de mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura e substituição de pares de bases, de ação direta e indireta, na atmosfera das três áreas estudadas.

As amostras de inverno e outono da estação de Pinheiros, e verão e outono de Cubatão apresentaram indícios de mutagenicidade para a linhagem TA100 na ausência e presença de ativação metabólica respectivamente, uma vez que houve um efeito dose-resposta mas a razão de mutagenicidade não atingiu o índice de dois.

As curvas dose-resposta dos "pools" de inverno, primavera, verão e outono procedentes do Parque D.Pedro, Pinheiros e Cubatão para as linhagens TA98 e TA100 com e sem S9 são apresentados nas Figuras 6, 7 e 8, respectivamente.

Nas três áreas estudadas, observou-se maior potência para a linhagem TA98, principalmente na ausência de ativação metabólica, nos extratos orgânicos de material particulado de ar coletados na primavera, verão e outono, indicando uma prevalência de mutágenos diretos que causam deslocamento de quadro de leitura. Nos "pools" de inverno

observou-se uma maior potência frente a linhagem TA100, principalmente na presença de S9, indicando a presença, nessas amostras, de promutágenos que causam preferencialmente substituição de pares de base. Nas amostras coletadas em Vila Parisi, Cubatão, doses acima de 40 µg/placa do extrato de primavera e 20 µg/placa do extrato de verão foram tóxicas para a linhagem TA98.

As respostas mutagênicas expressas por massa de extrato orgânico e volume de ar estão resumidas nas Tabelas 6 e 7. As concentrações mínimas efetivas (CME) dos extratos orgânicos também foram apresentadas nessas tabelas.

Durante o inverno, os níveis de atividade mutagênica foram baixos para a linhagem TA98 com e sem S9, variando de 0,30 a 0,45 revertentes/µg, com um CME entre 77,27 e 117,59 µg. Os índices mais elevados de mutagenicidade nesta estação do ano foram obtidos com *S. typhimurium* TA100 na presença de atividade metabólica, principalmente para o Parque D. Pedro (4,05 revertentes/µg; CME: 25,24 µg). Os extratos de material particulado das demais estações do ano apresentaram uma variação de 1,23 a 7,43 revertentes/µg para linhagem TA98 e 0,34 a 7,21 para a linhagem TA100, enquanto o CME obtido foi de 3,71 a 31,26 µg para a TA98 e 27,56 a 170,68 µg para a TA100, evidenciando a melhor sensibilidade da linhagem TA98 na detecção dos mutágenos presentes na atmosfera de PDP, PIN e CP, como já pôde ser observado nas curvas dose-resposta (Fig. 6 a 8). Os maiores índices de revertentes por µg de extrato e m³ de ar para linhagem TA98 foram observados durante a primavera, no Parque D. Pedro; verão, em Cubatão, e primavera e outono, em Pinheiros. Os menores valores de CME foram obtidos durante a primavera e verão no Parque D. Pedro; primavera, em Pinheiros, e verão, em Cubatão.

3.8.4.1.2. Atividade mutagênica para as linhagens de *S. typhimurium* nitroreductase-deficientes

Os extratos orgânicos dos "pools" de material particulado da atmosfera de Parque D. Pedro, Pinheiros e Cubatão foram analisados frente às linhagens TA98 e as nitroreductase-deficientes TA98NR e TA98/1,8DNP₆, na ausência de ativação metabólica, para avaliar a contribuição de nitrocompostos na resposta mutagênica dessas amostras. Os "pools" de verão de Pinheiros e inverno e verão de Cubatão não foram testados devido à insuficiência de MOE. As curvas dose-resposta para as diferentes linhagens estão apresentadas na Fig. 9.

Todas as amostras apresentaram um decréscimo significativo na atividade mutagênica quando testadas frente às linhagens nitroareno resistentes, em comparação com a linhagem parental TA98, indicando a presença de nitroarenos nesses extratos de material particulado (Tabela 8, Fig. 9 e 10). No Parque D. Pedro, a porcentagem da redução de atividade mutagênica esteve próxima a 60% para a linhagem TA98NR, nas amostras de inverno, primavera e verão, enquanto no outono foi de 41%. Para a linhagem TA98/1,8DNP₆ a redução de resposta mutagênica chegou a atingir 74% durante a primavera e verão, indicando uma possível contribuição de dinitropirenos na resposta mutagênica observada nessas amostras. Em Pinheiros e Cubatão não houve uma diferença relevante entre as duas linhagens nitroreductase-deficientes, sendo observadas reduções de mais de 80% nas amostras de inverno de Pinheiros e primavera de Cubatão.

A Fig. 10 mostra graficamente a redução da resposta mutagênica induzida pela linhagem TA98 e a média das concentrações máximas de ozônio nas quatro diferentes estações do ano para a atmosfera do Parque D. Pedro e Cubatão (em Pinheiros não foram avaliados os índices de ozônio no período de estudo). Os índices mais altos de ozônio foram detectados durante a primavera e verão em PDP e durante a primavera em CP, sendo que em Cubatão esteve sempre acima de 50 µg/m³. Os picos de concentração de ozônio coincidem com as maiores reduções de atividade mutagênica nessas duas áreas, sugerindo a ocorrência da formação de mutágenos oxidativos por reações fotoquímicas na atmosfera.

3.8.4.2. Extratos orgânicos das amostras "H"

As amostras que apresentaram maior concentração mensal de material particulado em suspensão, denominadas amostras "H", foram testadas quando à mutagenicidade frente à linhagem TA98 na presença e ausência de atividade mutagênica. As curvas dose-resposta da atividade mutagênica dos extratos orgânicos procedentes do Parque D. Pedro, Pinheiros e Cubatão estão reunidas nas Fig. de 11 a 16. Todas as amostras "H" apresentaram efeito dose resposta significativo e razão de mutagenicidade (RM) maior de 2. A ativação metabólica não modificou ou diminuiu a resposta mutagênica, exceto para as amostras de julho, novembro e dezembro de PDP (Fig. 11 e 12); junho e janeiro de PIN (Fig. 13 e 14) e, junho e dezembro de CP (Fig. 15 e 16), onde os índices de mutagenicidade foram ligeiramente mais altos na presença de S9.

A atividade mutagênica específica expressa em revertentes por µg de MOE é apresentada na Tabela 9. No Parque D. Pedro, a atividade mutagênica específica variou de 0,78 a 4,53 revertentes/µg, com os maiores índices registrados em agosto e setembro. Em

Pinheiros, os valores de revertentes por μg estiveram entre 0,93 a 5,37, sendo este último registrado no mês de setembro. Em Vila Parisi, Cubatão, a atividade mutagênica específica variou de 0,78 a 3,39 revertentes/ μg , com o maior valor registrado em dezembro, na presença de ativação metabólica.

A atividade mutagênica das amostras "H" por volume de ar (revertentes/ m^3) é apresentada na Tabela 10 e Fig. 17. A Fig. 17 mostra graficamente as concentrações de PTS e MOE. Os índices de mutagenicidade foram bastante variáveis, sendo que no mês de agosto foram observados os valores mais elevados de revertentes/ m^3 na ausência de S9, em PDP (246,4 rev/ m^3) e CP (31,5 rev/ m^3), enquanto em Pinheiros as amostras de setembro foram as mais mutagênicas por volume de ar (97,7 rev/ m^3). Em março, foram registrados os níveis mais baixos de mutagenicidade direta e indireta em todas as áreas estudadas.

Dois picos de mutagenicidade, um em junho (TA98+S9) e outro em setembro (TA98-S9), foram observados em Pinheiros, e durante os outros meses, a potência das amostras variou de 8,8 a 31,1 revertentes/ m^3 . Os níveis mais baixos de mutagenicidade por volume de ar foram registrados em Cubatão e os mais elevados no Parque D. Pedro (Tabela 10 e Fig. 17). Essa diferença na potência das amostras das três estações estudadas é melhor visualizada no gráfico de Box and Whisker na Fig. 18, que mostra a mediana, percentil 25 e 75, além dos valores máximos e mínimos de revertentes/ m^3 nos extratos orgânicos procedentes do Parque D. Pedro, Pinheiros e Cubatão.

Os resultados apresentados na Tabela 11 e Fig. 17 demonstram uma correlação positiva entre partículas totais em suspensão (PTS) e material orgânico extraído (MOE); PTS e revertentes/ m^3 , e concentração de MOE e revertentes/ μg , com maior nível de significância para o Parque D. Pedro.

3.8.5. TESTE DE KADO

Os extratos orgânicos dos "pools" de material particulado foram analisadas quanto à atividade mutagênica frente às linhagens de *S. typhimurium* TA98 e TA100 e, por se tratar de um microensaio, foi possível avaliar essas amostras também frente as linhagens TA97a e TA104. Somente as amostras de verão de Pinheiros e Cubatão foram exclusivamente analisadas frente à linhagem TA98, devido à insuficiência de material orgânico extraído. Todas as amostras apresentaram atividade mutagênica frente a todas as linhagens em pelo menos uma das condições do teste (+ S9 ou - S9) (Tabela 12), indicando a presença de mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura e substituição de pares de bases no DNA, inclusive possíveis aldeídos, detectados pela TA104.

A linhagem de *S. typhimurium* TA104, na presença de atividade metabólica, apresentou indícios de mutagenicidade ou resposta negativa para a maioria das amostras, principalmente as procedentes de PDP e PIN (Tabela 12). Para estas duas áreas, não foi possível quantificar a resposta da linhagem TA97a com S9 nos "pools" de outono, pois, embora a razão de mutagenicidade fosse maior que dois, a correlação não mostrou resultados significativos.

A atividade mutagênica dos extratos orgânicos de material particulado de ar foi reduzida na presença de ativação metabólica, (exceto nas amostras de inverno do Parque D. Pedro e Pinheiros) (Tabela 12), indicando uma prevalência de mutágenos de ação direta.

As concentrações mínimas efetivas (CME em μg), apresentadas na Tabela 12 e Fig. 19, demonstram que a linhagem mais sensível na detecção de mutágenos foi a TA98 (CME: 0,58 a 45,31 μg), seguida pela linhagem TA97a (CME: 1,49 a 58,02 μg). A mutagenicidade específica dos extratos orgânicos no teste de Kado foi mais elevada na primavera e verão nas três áreas de estudo. Estes resultados confirmam a predominância de mutágenos que causam deslocamento no quadro de leitura no material particulado das áreas estudadas. Valores relevantes de CME também foram obtidos para a linhagem TA104 (mediana 15,3 μg), mais eficiente na detecção de mutágenos diretos como formaldeído, α,β -aldeídos de cadeia longa e compostos dicarbonil.

A Tabela 13 reúne os dados de mutagenicidade expressos por volume de ar (revertentes/ m^3) para o teste de Kado. De forma global, no Parque D. Pedro as amostras de primavera e verão foram as que apresentaram maior número de revertentes/ m^3 e conseqüentemente menores CME. Em Pinheiros e Cubatão, desconsiderando os dados de verão que apresentam resultado somente para a linhagem TA98, as amostras da primavera foram as que apresentaram maior mutagenicidade por m^3 .

3.8.6. ENSAIO DE MUTAÇÃO DIRETA

O ensaio de microssuspensão de mutação direta em *S. typhimurium* TM677 foi avaliado para detecção da atividade mutagênica dos extratos orgânicos dos "pools" de material particulado da atmosfera do Parque D. Pedro, Pinheiros e Cubatão. As freqüências de mutação obtidas para a linhagem TM677, na presença e ausência de ativação metabólica, em diferentes doses das amostras analisadas, estão representadas graficamente nas Fig. 20, 21 e 22, para os extratos orgânicos de PDP, PIN e CP, respectivamente.

Os extratos orgânicos dos "pools" de inverno de PDP e CP, embora apresentassem uma razão de mutagenicidade acima de 2 e um efeito dose-resposta, não apresentaram coeficiente de correlação estatisticamente significativo. As amostras de inverno e primavera do Parque D.Pedro e inverno em Pinheiros foram negativas na presença de S9, enquanto a amostra de outono de PIN foi negativa na ausência de S9. É importante observar que a frequência de mutantes espontâneos (colônias 8-azaguanina resistentes) foi muito elevada para os experimentos dos "pools" de outono, e não foi possível repetir os experimentos devido à insuficiência de MOE.

A análise das curvas dose-resposta permite evidenciar um melhor efeito dose-resposta para todos os "pools" de primavera e verão na ausência de ativação metabólica, enquanto no inverno melhores efeitos foram observados na presença de fração S9.

As frequências de mutação expressa por massa de MOE (frequência de mutantes $\times 10^{-5}/\mu\text{g}$) e volume de ar (frequência de mutantes $\times 10^{-5}/\text{m}^3$), bem como o CME para as amostras atmosféricas das três áreas estudadas, estão resumidas nas Tabelas 14 e 15. Para várias amostras não foi possível calcular o CME, uma vez que a reta de regressão cortava o eixo do y abaixo do zero. A maior frequência de mutantes foi observada no outono para o Parque D.Pedro, na primavera e verão para PIN, e primavera para CP.

3.8.7. SOS CROMOTESTE

O ensaio SOS Cromoteste foi avaliado para detecção da atividade mutagênica dos extratos orgânicos dos "pools" de material particulado da atmosfera do Parque D.Pedro, Pinheiros e Cubatão.

As curvas dose-resposta dos "pools" de inverno, primavera, verão e outono procedentes do Parque D.Pedro, Pinheiros e Cubatão para a linhagem de *E.coli* PQ37 com e sem S9 são apresentados nas Figuras 23, 24 e 25, respectivamente.

Os fatores de indução obtidos, na presença e ausência de ativação metabólica, bem como as concentrações mínimas efetivas de amostra (concentrações que dobram o efeito genotóxico) (CME em μg e m^3) para as amostras atmosféricas das três áreas estudadas são apresentados na Tabela 16.

As amostras foram positivas frente ao SOS Cromoteste, com exceção das amostras de inverno do Parque D.Pedro que apresentou toxicidade nas doses testadas. A amostra de verão de Pinheiros não foi testada devido a insuficiência de MOE disponível para teste.

No entanto, para várias amostras não foi possível calcular o SOSIP, pois embora tenha sido observado efeito dose-resposta, não foi observada coeficiente de correlação estatisticamente significativo. Os ensaios também não puderam ser repetidos por insuficiência de MOE disponível para teste.

As amostras mais potentes frente a esse ensaio foram os extratos orgânicos dos "pools" de outono seguidos dos "pools" de primavera. Só foi possível calcular a potência da amostra proveniente de Cubatão - outono (CME: 4,17 μg) e de Pinheiros - (CME: 7,18 μg). As amostras dos "pools" de inverno foram as menos potentes, tendo inclusive apresentado resultados negativos com ativação metabólica.

3.8.8 INDUTESTE

O ensaio Induteste foi avaliado para detecção de atividade mutagênica dos extratos orgânicos dos "pools" de material particulado da atmosfera do Parque Dom Pedro, Pinheiros e Cubatão.

As curvas dose-resposta dos "pools" de inverno, primavera, verão e outono procedentes do Parque D.Pedro, Pinheiros e Cubatão com e sem S9 são apresentados nas Figuras 26, 27 e 28, respectivamente.

As unidades formadoras de placa por μg ou m^3 , na presença e ausência de ativação metabólica, bem como as concentrações mínimas efetivas (CME em μg ou m^3) (concentrações capazes de induzir o dobro da resposta genotóxica) para as amostras das três áreas estudadas são apresentados na Tabela 17.

Todas as amostras foram testadas frente ao Induteste, apresentando resultados positivos, com exceção da amostra de verão de Pinheiros, a qual não foi testada por insuficiência de material orgânico.

No entanto, para várias amostras não foi possível calcular o número de unidades formadoras de placas (UFP/ μg ou m^3), pois embora tenha sido observado efeito dose resposta, não foi observado coeficiente de correlação estatisticamente significativo, e os ensaios não puderam ser repetidos devido a insuficiência de material orgânico. Observou-se uma grande variação de UFP/placa nos controles negativos gerando valores de potências expressos em UFP/placa desproporcionais em relação a potência expressa em CME (Tabela 17). Apesar disso, o CME foi utilizado para expressar a potência, pois sua unidade permite comparações entre os diferentes ensaios.

As amostras mais potentes foram os extratos orgânicos do “pool” de inverno da amostra proveniente do Parque D.Pedro (CME: 7,50 µg), seguido do “pool” de outono de Cubatão (CME: 9,19 µg).

Os “pools” de inverno provenientes dos três locais amostrados e os “pools” de primavera do Parque D.Pedro e Cubatão apresentaram resultados negativos quando testados com ativação metabólica.

3.8.9 COMPARAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS MICROBIANOS DE MUTAGENICIDADE

As respostas mutagênicas obtidas nos testes de Ames e Kado são comparadas diretamente, pois o “endpoint” dos dois testes é o mesmo e a potência de ambos pode ser expressa em revertentes por µg. Já os outros ensaios, por basearem-se em diferentes “endpoints” são comparados através da concentração mínima efetiva (CME) em µg de MOE, que é a dose capaz de dobrar a resposta genotóxica em cada um dos ensaios.

3.8.9.1. Comparação entre os testes de Ames e Kado

A Tabela 18 apresenta a razão obtida entre a potência (revertentes/µg) nos testes de Kado e Ames. Observa-se que esses valores variaram de 0,5 a 24, dependendo da amostra e da linhagem, bem como das condições de metabolização utilizada nos ensaios (Tabela 18). Em média o teste de Kado foi 5 a 10 vezes mais sensível que o teste de Ames, considerando-se somente a linhagem TA98 (+S9 e - S9 respectivamente). Já para a linhagem TA100, a sensibilidade do teste de Kado foi 3,7 a 6,2 vezes maior que o teste de Ames.

A correlação entre as atividades mutagênicas obtidas nos dois ensaios só foi estatisticamente significativa para a linhagem TA98 na ausência de S9, e mostra que o teste de Ames foi praticamente oito vezes mais sensível na detecção de mutágenos diretos que o teste de Ames, baseando-se no valor da inclinação da reta regressão (Fig. 29). Embora seja evidente a maior sensibilidade do teste de Kado para a maioria das amostras testadas com a TA98+S9, TA100 - e + S9, os coeficientes de correlação obtidos não foram estatisticamente significativos. Uma observação interessante foi que houve uma menor sensibilidade relativa do teste de Kado, na condição +S9 que na condição -S9, o que poderia ser explicada pela detoxificação de compostos presentes na amostra durante o procedimento de pré incubação

inerente ao ensaio, quando compara-se com o teste de Ames que foi realizado pelo método de incorporação em placas.

3.8.9.2. Comparação entre os cinco bioensaios microbianos

A Tabela 19 mostra os valores de CME em m^3 obtidos para cada ensaio avaliado: teste de Kado, teste de Ames, mutação direta, Cromoteste e Induteste. Além disso, foram apresentados o número de amostras testadas para cada um dos ensaios (n) aonde foi possível o cálculo do CME, bem como os valores de mediana, mínimos e máximos. Estes dados também podem ser observados na Figura 30.

Observa-se que o teste de Kado apresenta maior sensibilidade. O teste de Ames, o teste de mutação direta e o Cromoteste mostram uma mesma faixa de sensibilidade, com valores de mediana de 5 a $7,5 m^3$ de CME (Figura 30). O Induteste poderia ser considerado mais sensível que os três últimos, com mediana de $3,2 m^3$ de CME (Figura 30), porém a variabilidade inerente desse ensaio associado ao pequeno número de amostras testadas (n=7) dificulta essa afirmação.

3.9. DISCUSSÃO

3.9.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ÍNDICES DE POLUIÇÃO DAS ÁREAS ESTUDADAS.

Dos poluentes atmosféricos medidos regularmente nas três estações estudadas em São Paulo e Cubatão somente as concentrações de dióxido de enxofre estiveram dentro dos padrões de qualidade do ar (diário: $365 \mu\text{g}/\text{m}^3$; $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Dados históricos mostram que a concentração de SO_2 decresceu sensivelmente nos últimos anos nos pontos de amostragem do Programa de Controle de Poluição do Ar (CETESB, 1992; ALONSO, 1989), mostrando ser um poluente já controlado na atmosfera de São Paulo e Cubatão. Essa redução está relacionada ao cumprimento de metas estabelecidas pelo programa de controle de poluição, que inclui a utilização de óleos combustíveis com baixo teor de enxofre nas indústrias, bem como a introdução do combustível à álcool e, a adição de álcool à gasolina que reduzem os teores de enxofre na atmosfera.

Os dados relativos a partículas totais em suspensão (PTS) mostram que, no Parque D. Pedro e mais frequentemente em Vila Parisi, o padrão de qualidade do ar para 24 horas ($240 \mu\text{g}/\text{m}^3$) é rotineiramente excedido, bem como o padrão anual ($80 \mu\text{g}/\text{m}^3$), mostrando um problema de poeira em suspensão bastante sério principalmente nos meses mais frios. Embora os processos industriais sejam as principais fontes de particulado, os veículos geram partículas que são emitidas ao nível da rua e não a níveis mais altos como as fontes industriais. Isto é importante porque as emissões de fontes industriais são normalmente dispersadas antes de atingir o receptor enquanto as emissões ao nível da rua podem freqüentemente expor o público a concentrações muito mais altas de poluentes. Ainda, essas partículas podem representar um risco maior à saúde pública por se tratarem de partículas inaláveis com alta persistência na atmosfera.

Em relação ao dióxido de nitrogênio (NO_2) medido na estação do Parque D. Pedro, verificou-se que a média anual de $89 \mu\text{g}/\text{m}^3$ durante o período de estudo atendeu os padrões de qualidade do ar ($100 \mu\text{g}/\text{m}^3$). No entanto, altas concentrações de NO_2 foram detectadas durante o período de junho a outubro de 1990 e, por onze vezes, foi ultrapassado o padrão horário estabelecido pela Legislação Brasileira ($320 \mu\text{g}/\text{m}^3$), sendo registrados índices de até $466 \mu\text{g}/\text{m}^3$ em julho de 1990 (CETESB, 1991b, 1992).

Os dados de qualidade do ar no Parque D. Pedro indicaram que o padrão horário de ozônio ($160 \mu\text{g}/\text{m}^3$) foi excedido em 12,5% dos dias durante o período de novembro de 1990 a fevereiro de 1991, quando a radiação solar é mais alta, o que contribui para as altas concentrações mensais observadas durante esse período (Fig.7).

3.9.2. MATERIAL PARTICULADO E EXTRATO ORGÂNICO DAS AMOSTRAS "POOL" E "H"

As concentrações de partículas totais em suspensão (PTS) das amostras "pool" e "H" registradas nesse estudo apresentaram variações sazonais nas três áreas amostradas, com aumento significativo desse poluente durante o inverno e primavera quando são registradas temperaturas mais baixas e inversões térmicas, o que dificulta a dispersão dos poluentes. Essas diferenças foram mais significativas no Parque D. Pedro (PDP) e em Pinheiros (PIN) do que em Vila Parisi, Cubatão, onde mesmo no verão e outono, foram registrados índices elevados de PTS. Esses dados indicam uma participação maior de fontes pontuais contribuindo para os índices de PTS em Cubatão em relação aos outros pontos amostrados.

As concentrações de PTS nas áreas estudadas em São Paulo e Cubatão são similares ou inferiores às registradas em Kaohsiung, Taiwan (LEE *et al.*, 1994) e Santiago, Chile (ADONIS & GIL, 1993) onde foram detectados índices de até $480,7 \pm 183,9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e $542 \pm 145 \mu\text{g}/\text{m}^3$, respectivamente. Os índices de PTS obtidos neste estudo, no inverno, estão entre os mais elevados daqueles relatados para os grandes centros urbanos.

Os efeitos adversos do material particulado na atmosfera começam pelo aspecto estético, pois este interfere na visibilidade e está associado com a produção de corrosão e sujeiras em superfícies (edifícios, tecidos, outros materiais). Os efeitos sobre a saúde estão associados à capacidade do sistema respiratório em remover as partículas no ar inalado, retendo-as no pulmões. Estas partículas podem conter substâncias minerais que possuem propriedades tóxicas e compostos orgânicos, como uma série de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de potencial cancerígeno conhecido. Além disso, as partículas finas têm a capacidade de aumentar os efeitos fisiológicos de gases irritantes também presentes no ar ou de catalizar e transformar quimicamente estes gases, produzindo substâncias mais nocivas. (CETESB, 1991b).

Embora, quando se utiliza esse parâmetro, seja considerado o risco à saúde decorrente da presença de compostos orgânicos no material particulado atmosférico, essa determinação não fornece informação qualitativa ou quantitativa sobre os compostos orgânicos presentes na atmosfera. Portanto, a identificação e quantificação de compostos orgânicos no material

particulado de ar e o estudo de sua atividade biológica é de suma importância para se estabelecer o risco destes compostos não só para o homem, mas também para a flora e fauna.

ADONIS & GIL (1993) observaram um aumento significativo na concentração de material orgânico extraído por diclorometano (DCM), na atmosfera da região central de Santiago do Chile durante o outono ($26 \pm 22 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e inverno ($33 \pm 15 \mu\text{g}/\text{m}^3$) quando comparado com os meses de temperaturas mais elevadas (verão: $9 \pm 2 \mu\text{g}/\text{m}^3$; primavera: $11 \pm 3 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Dados similares foram observados por CREBELLI *et al.* (1988) para extratos obtidos em DCM procedentes da atmosfera da cidade de Roma, Itália (inverno: $31 \mu\text{g}/\text{m}^3$; primavera: $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$; verão: $14 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

BUTLER *et al.* (1985) em estudo sobre a atividade mutagênica de extratos orgânicos (ciclohexano, diclorometano e acetona) de material particulado da atmosfera de cinco grandes centros urbanos (Filadélfia, Nova Iorque e Elizabeth, EUA; Pequim, China; e Cidade do México, México), detectaram as maiores concentrações de material orgânico total na cidade do México ($39,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e Pequim ($30,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$), sendo os menores valores observados em Nova Iorque ($11,6 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Em geral a fração obtida pela extração de diclorometano constituiu a menor porcentagem do extrato orgânico total, entretanto foi a de maior potencial mutagênico.

As concentrações dos extratos em diclorometano obtidas na presente pesquisa, também foram dependentes das variações sazonais, com valores elevados no inverno e primavera para as amostras procedentes do Parque D. Pedro e Pinheiros, chegando a atingir índices de $54,4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ em agosto de 1990 no Parque D. Pedro, nas amostras "H". Os níveis desta fração orgânica para as amostras de Vila Parisi, Cubatão, foram baixos e praticamente não apresentaram variação sazonal, sugerindo que essas amostras têm um alto conteúdo de poeira de rua e poluentes inorgânicos.

Quando os resultados obtidos nas amostras dos "pools" e nas amostras "H" foram comparados, verificou-se que existe uma diminuição significativa do material orgânico nas amostras combinadas em "pools". Esses resultados são esperados, uma vez que as amostras "H" são as que apresentaram maiores índices de PTS, e os "pools" são compostos por 13 a 15 amostras com concentrações diferentes de PTS, onde os valores elevados de MOE foram diluídos por aqueles com menores concentrações de orgânicos.

Dados compilados de vários estudos relativos à extração de material particulado de ar pela técnica de ultrassom, demonstraram uma recuperação de 4,5 a 11,2% da massa particulada (MOE) utilizando-se o solvente DCM (ADONIS & GIL, 1993; MAY *et al.*, 1992). No presente estudo a porcentagem de MOE variou de 1,9% a 13,4% para as amostras de "pool" e 1,4% a 17,8% para as amostras "H". As porcentagens de material

orgânico extraído foram significativamente mais elevadas nas estações de São Paulo (5,3% a 17,8%) do que em Cubatão (1,4% a 3,2%). Na Região Metropolitana de São Paulo, o material particulado resulta, principalmente, da poeira de rua e emissão de veículos automotores, os quais contribuem significativamente para emissão de compostos orgânicos na atmosfera, enquanto em Vila Parisi, Cubatão, os índices elevados de PTS são devidos a emissões de origem inorgânica das indústrias de fertilizantes, o que pode explicar a baixa recuperação de compostos orgânicos nesta área.

É importante observar que, embora as amostras da estação de Pinheiros (PIN) tenham atendido aos padrões diários ($240 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e anual ($80 \mu\text{g}/\text{m}^3$) de PTS, foram as que apresentaram maiores porcentagens de recuperação de material orgânico. Essa resposta pode estar associada à maior seletividade do processo de extração pela menor ação de interferentes nas amostras, ou à maior concentração real de compostos orgânicos no material particulado. O fracionamento e caracterização química dessas amostras seriam importantes para elucidar esse comportamento.

3.9.3. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DE MATERIAL PARTICULADO DE AR

As amostras dos "pools" de material particulado foram avaliadas quando ao seu potencial mutagênico frente a cinco ensaios microbianos: o teste de Ames, o teste de Kado, o ensaio de mutação direta em *S. typhimurium* TM677 ("microforward"), o SOS Cromoteste e o Induteste.

Entre os ensaios selecionados, o ensaio de mutação gênica reversa em *S. typhimurium* - teste de Ames - é o mais validado e amplamente empregado na caracterização da atividade mutagênica de compostos químicos e misturas complexas. Uma análise extensiva da performance deste ensaio com base em classes de compostos químicos (CLAXTON *et al.*, 1988) mostrou que sua sensibilidade para as diferentes classes químicas varia de 63% a 92%. O teste de Ames é muito eficiente na detecção de nitrocompostos e hidrocarbonetos cancerígenos, mas é pouco eficiente na detecção de carcinógenos halogenados ou inorgânicos.

Um enfoque conservativo na interpretação dos testes de curta duração seria considerar que, para qualquer bioensaio de curta ou longa duração ser aceito na triagem de misturas complexas para carcinogenicidade, deveria apresentar especificidade e sensibilidade equivalente a dos bioensaios em roedores (HOUK & WATERS, 1996). BRUSICK (1983) mostrou que, quando são comparados dados de bioensaios de ratos e camundongos, a

sensibilidade varia de 70% a 85%, e a especificidade, de 58% a 75%. HOUK & WATERS (1996), combinando todas as avaliações da performance do teste de Ames, obtiveram uma especificidade de 77% e uma sensibilidade de 64%. Esses achados dão suporte à utilização do teste de Ames para triagem do potencial cancerígeno de misturas complexas. Além disso, tem sido demonstrado que o ensaio de mutação gênica reversa com *Salmonella* detecta a maioria dos cancerígenos de risco humano, do Grupo I da International Agency for Research Cancer (IARC).

A aplicação do teste de Ames na caracterização da atividade mutagênica de extratos de material particulado da atmosfera de São Paulo e Cubatão, mostrou que, em geral, os níveis de atividade mutagênica específica medidos com a linhagem TA98 foram mais altos ou similares à TA100, exceto durante o inverno onde os maiores índices de mutagenicidade foram observados frente à linhagem TA100, na presença de ativação metabólica. Esses resultados confirmam a sensibilidade da linhagem TA98 em revelar mutagenicidade de extratos de material particulado de ar não fracionado (De FLORA *et al.*, 1989; De RAAT, 1988; LEE *et al.*, 1994). A adição de S9 não modificou significativamente a mutagenicidade da maioria das amostras analisadas.

As respostas de mutagenicidade obtidas frente ao teste de Ames para os "pools" indicam a predominância de mutágenos de ação direta que causam deslocamento de quadro de leitura. A ocorrência deste tipo de mutágenos, adsorvidos a material particulado de ar, tem sido demonstrada em amostras de ar urbano coletadas em várias regiões do planeta (ADONIS & GIL, 1993; BARALE *et al.*, 1989; CHRISP & FISHER, 1980; COMMONER *et al.*, 1978; CREBELLI *et al.*, 1988; De RAAT & De MEIJERE, 1988; LEE *et al.*, 1994; MÖLLER & ALFHEIM, 1980; PITTS, 1985; PITTS *et al.*, 1977; SIAK *et al.*, 1985, TALCOTT & WEI, 1977; TOKIWA *et al.*, 1983), e os derivados de PAH, principalmente os nitro-PAHs e as formas oxigenadas têm sido associadas a essa resposta (ADONIS & GIL, 1993; CREBELLI *et al.*, 1988; De RAAT & De MEIJERE, 1988; PITTS, 1985; SIAK *et al.*, 1985).

Vários estudos têm demonstrado que os PAHs não substituídos não fornecem uma contribuição importante para a resposta mutagênica induzida por material particulado de ar (não fracionado) no teste de Ames (De FLORA *et al.*, 1989; De RAAT, 1988; LEE *et al.*, 1994). Além disso, foi observado que a correlação entre as concentrações de PAHs e mutagenicidade de amostras não fracionadas quimicamente, principalmente as avaliadas pela linhagem TA98 de *S. typhimurium*, é bastante baixa, o que demonstra que os níveis de PAHs não predizem satisfatoriamente a mutagenicidade dessas misturas complexas (De RAAT, 1988; KRAMERS, 1987; LEE *et al.*, 1994).

Entretanto, De FLORA *et al.* (1989) estudando a correlação da mutagenicidade de material particulado não fracionado quimicamente com as correspondentes frações de PAHs em amostras de ar da área urbana de Genova, Itália, observaram uma correlação significativa entre a potência mutagênica das frações de PAHs frente à linhagem TA100 na presença de S9 e as concentrações individuais de PAHs. Portanto, os maiores índices de mutagenicidade observados para a linhagem TA100 com S9, no inverno, podem indicar a maior contribuição dos PAHs não substituídos na resposta mutagênica dessas amostras.

A utilização do teste de Kado nesse estudo permitiu a inclusão de mais duas linhagens de *S. typhimurium* - TA97a e TA104- não utilizadas no teste de Ames, para a caracterização da mutagenicidade dos extratos orgânicos de material particulado. Os dados obtidos nesse ensaio mostraram uma maior sensibilidade das linhagens TA98 e TA 97a na detecção de mutágenos nos extratos orgânicos de material particulado das três estações analisadas, e confirmam os resultados obtidos no teste de Ames, onde se detectou uma predominância de mutágenos do tipo "frameshift" de ação direta.

A linhagem TA104, sensível na detecção da mutagenicidade de aldeídos, foi também incluída neste estudo em decorrência do uso extensivo, no Brasil, do etanol como combustível, responsável pela circulação de 40% da frota total de carros leves, ou seja 4,2 milhões de veículos.

O uso do etanol como combustível tem sido proposto como uma solução para reduzir os níveis de chumbo, dióxido de enxofre, monóxido de carbono e hidrocarbonetos na atmosfera e tem desempenhado um papel fundamental na estratégia de controle de emissões atmosféricas nos grandes centros urbanos do país (LOFTI *et al.*, 1990; SZWARC, 1993).

As emissões de carros à álcool são constituídas, fundamentalmente, de etanol (cerca de 60%), aldeídos e hidrocarbonetos. O etanol tem uma reatividade fotoquímica menor do que os hidrocarbonetos, especialmente olefinas, e é consideravelmente menos tóxico. As emissões de aldeído consistem de aproximadamente 85% de acetaldeído, 14% de formaldeído e 1% de aldeídos de cadeia longa. As emissões de aldeído dos veículos à álcool são três vezes maiores do que os veículos à gasolina, entretanto, esse combustível, que no Brasil contém 22% de etanol, produz muito mais formaldeído, o qual é considerado mais tóxico e de maior reatividade fotoquímica (SZWARC, 1993)

Por outro lado, TANNER *et al.* (1988), estudando os efeitos das emissões de veículos usando etanol ou combustível contendo etanol, no ar urbano do Rio de Janeiro, observaram que altas concentrações de aldeído (com razão formaldeído/acetaldeído baixa) estavam relacionadas com o aumento das taxas de formação de peroxiacetil-nitrato (PAN) na atmosfera, principalmente no período da manhã. O PAN é formado na atmosfera, a partir

do acetaldeído, através de reação fotoquímica, sendo um agente fitotóxico potente e de potencial mutagênico conhecido (CLAXTON *et al.*, 1990). Este composto, presente na fumaça fotoquímica, pode reagir com os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e dar origem, ainda, a uma variedade de produtos oxigenados mutagênicos de ação direta (PITTS *et al.*, 1978), que podem estar contribuindo para a mutagenicidade total das amostras analisadas.

LOFTI *et al.* (1990) avaliaram o potencial mutagênico de emissões de veículos à álcool, através do teste de Ames, usando o método de exposição direta, e detectaram atividade mutagênica frente à linhagem TA102 que indica mutágenos do tipo oxidante. Entretanto, não foi detectada mutagenicidade frente à linhagem TA104, mais específica para aldeídos.

Todos os "pools" de extratos orgânicos testados frente à linhagem TA104 no teste de Kado apresentaram mutagenicidade na ausência de ativação metabólica, e a adição de S9 reduziu ou eliminou essa resposta. Compostos como o formaldeído, acroleínas e α,β -aldeídos de cadeia longa, formados na combustão do etanol, têm sido relatados como mutágenos diretos frente à linhagem TA104. Esses resultados demonstram a necessidade de se conduzir estudos mais específicos para se avaliar a atividade biológica das emissões de veículos à álcool e "gasoálcool", e seus efeitos à saúde da população dos grandes centros urbanos.

Resultados significativos com a linhagem TA104 foram também observados nas amostras de Vila Parisi, Cubatão. Embora essa área esteja sob a influência mais direta dos poluentes de indústrias de fertilizantes, poluentes como os aldeídos e cetonas podem ser liberados na área por indústrias químicas e petroquímicas.

A linhagem TA104 é bastante sensível também na detecção de quinonas de PAHs, compostos gerados pela combustão de material orgânico e encontrado em emissões de veículos, fumaça de cigarro e material particulado de ar urbano. No entanto, esses compostos necessitam de ativação metabólica para expressar sua mutagenicidade, diferentemente do observado no presente estudo, onde a linhagem TA104 detectou predominantemente mutágenos de ação direta.

Os resultados obtidos nos ensaios "microforward", SOS Cromoteste e Induteste não trouxeram nenhuma contribuição adicional significativa às informações obtidas nos testes de Ames e Kado, na caracterização da atividade mutagênica das amostras de extrato orgânico de material particulado de ar dos pontos amostrados.

3.9.3.1. Contribuição dos nitro-PAHs na mutagenicidade das amostras de material particulado de ar

A presença de mutágenos diretos em extratos orgânicos de material particulado de ar está associada, principalmente, a compostos formados pela reação do benzo(a)pireno e outros hidrocarbonetos policíclicos aromáticos com ozônio, dióxido de nitrogênio, PAN e outros radicais livres presentes na atmosfera (PITTS *et al.*, 1978). Entre esses compostos, os nitroarenos têm sido os de maior interesse de estudo, devido à sua capacidade de induzir tumores em animais experimentais (ESPINOSA- AGUIRRE *et al.*, 1993).

A contribuição dos nitroarenos para a mutagenicidade total de extratos orgânicos de material particulado de ar tem sido reportada nas áreas urbanas de Los Angeles (PITTS *et al.*, 1982), Santiago do Chile (ADONIS & GIL, 1993), México (ESPINOSA-AGUIRRE *et al.*, 1993), Japão (SASAKI *et al.*, 1986), Taiwan (LEE *et al.*, 1994), Roma (CREBELLI *et al.*, 1988), Elizabeth, USA (GUNDEL *et al.*, 1993) entre outras, empregando linhagens de *Salmonella thyphimurium* nitroredutases deficientes.

Portanto, considerando (a) a predominância de mutágenos diretos obtidos nos extratos orgânicos das amostras analisadas no presente estudo, (b) a importância da contribuição das emissões de veículos para a poluição do ar, principalmente na Grande São Paulo e (c) a intensa radiação solar nas áreas de estudo, foi estimada a contribuição dos mono e dinitroarenos para a mutagenicidade direta detectada nos extratos orgânicos de material particulado das três áreas estudadas usando as linhagens TA98NR (resistente ao 1-nitropireno e deficiente em nitroredutases) e TA98/1,8-DNP₆ (resistente ao 1,6-DNP e 1,8-DNP, deficiente em nitroredutases e *O*-acetiltransferase).

Os dados obtidos mostraram um decréscimo substancial nas respostas mutagênicas de todas as amostras analisadas frente às linhagens nitropireno resistentes, quando comparadas com a linhagem TA98 parental, indicando que os mononitro e dinitroarenos contribuem significativamente para a mutagenicidade do material particulado de ar de São Paulo e Cubatão. Esses nitrocompostos resultam diretamente da combustão de gasolina e diesel, e de emissões industriais, ou podem ser produzidos pelas reações atmosféricas dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos com copoluentes presentes na fumaça fotoquímica (PITTS, 1985). A fotoativação de amins aromáticas e heterocíclicas são também fontes de nitroarenos (ADONIS & GIL, 1993). É importante considerar que os nitroarenos podem ser produzidos nos filtros durante o processo de coleta do material particulado (CLAXTON, 1983).

Os resultados expressos em revertentes/ μg (Tabela 8) mostram maior redução da atividade mutagênica com a linhagem TA98/1,8-DNP₆ (74%), do que a TA98NR (57%), para os "pools" de primavera e verão, nas amostras do Parque D. Pedro, indicando que os dinitropirenos têm uma contribuição mais significativa na mutagenicidade total dessas amostras. Resultados similares foram obtidos por GUNDEL *et al.* (1993) em extratos de acetona de material particulado de ar de Elizabeth, EUA, sendo registrado um decréscimo de 90% na atividade mutagênica frente à linhagem TA98/1,8DNP₆. CREBELLI *et al.* (1988) mostraram uma contribuição relativamente maior dos nitrocompostos na mutagenicidade de material particulado de Roma, Itália, também durante a primavera e verão.

ADONIS & GIL (1993) registraram contribuições similares de mononitro e dinitroarenos na mutagenicidade total dos extratos orgânicos coletados na atmosfera de Santiago do Chile, e associam estes nitrocompostos à emissões de diesel, indústrias e sistemas de aquecimento residencial, bem como a transformações ocorridas na atmosfera, provavelmente devido à reação de altas concentrações de PAHs com poluentes atmosféricos tais como ozônio, dióxido de nitrogênio e PAN.

ESPINOSA-AGUIRRE *et al.* (1993) associaram os altos índices de mutagenicidade, detectados nas amostras de inverno usando linhagens específicas para nitrocompostos, com a formação de nitroderivados formados pela reação de hidrocarbonetos aromáticos e óxidos de nitrogênio.

No presente estudo, os dados apresentados na Figura 10 mostram a relação entre a média da concentração máxima diária de ozônio, indicador de reações fotoquímicas na atmosfera, e a contribuição dos nitrocompostos na atividade mutagênica total detectada no Parque Dom Pedro e em Vila Parisi, nas diferentes estações do ano. As maiores médias de ozônio foram observadas na primavera e verão, em PDP, indicando que o processo fotoquímico pode ser responsável pelo aumento de nitrocompostos na atmosfera durante esse período. Associação similar entre redução de mutagenicidade frente às diferentes linhagens nitroreduzidas e o aumento dos níveis de ozônio, foi observada durante a primavera, em Vila Parisi, Cubatão. Os nitroarenos parecem não ter um papel importante na mutagenicidade do "pool" de outono no Parque Dom Pedro, uma vez que foram detectadas reduções de apenas 41% e 25% de mutagenicidade frente à linhagens TA98NR, TA98/1,8DNP₆, respectivamente (Tabela 8 e Fig. 10).

Nesta discussão é importante lembrar a possível participação do PAN, que pelo seu próprio potencial mutagênico, ou gerando novos nitrocompostos fotoquimicamente, pode estar contribuindo para a mutagenicidade total dos extratos orgânicos de material particulado no presente estudo.

Estudos adicionais devem ser conduzidos para se investigar a natureza química e concentração desses nitrocompostos detectados pelas linhagens nitroredutases deficientes, para se confirmar as fontes e mecanismos de formação desses compostos.

3.9.3.2. Variação sazonal da mutagenicidade dos extratos orgânicos atmosféricos

Os resultados obtidos mostram uma variação sazonal nos índices de mutagenicidade com os maiores números de revertentes por volume de ar (m^3) para a linhagem TA98, registrados no "pool" de primavera do Parque Dom Pedro e Pinheiros, áreas sob a influência de poluição veicular, e no "pool" de verão de Vila Parisi, área industrial. Em relação ao potencial mutagênico específico (μg) a sazonalidade observada foi a mesma, exceto para Pinheiros, onde o "pool" de outono foi o mais potente.

Diferentemente da maioria dos dados relatados na literatura, as amostras de "pool" de inverno foram as que apresentaram menores índices de mutagenicidade para a linhagem TA98. Normalmente esta atividade mutagênica, nos países que apresentam temperatura bastante baixa no inverno, está associada a concentrações elevadas de PAHs na atmosfera, decorrentes não somente das emissões veiculares e industriais, mas também do sistema de aquecimento doméstico, embora essa atividade esteja associada mais a promutágenos, e não a mutágenos diretos (ADONIS & GIL, 1993; ALFHEIM *et al.*, 1983; BARALE *et al.*, 1989; DAISEY *et al.*, 1980; FLESSEL *et al.*, 1991). Entretanto, as amostras de inverno dos três locais amostrados no presente estudo apresentaram resultados relevantes para a linhagem TA100, na presença de ativação metabólica, indicando a predominância de promutágenos, como, por exemplo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. As amostras do "pool" de outono do Parque Dom Pedro também apresentaram respostas significantes para a linhagem TA100 na presença de S9.

Esta baixa atividade mutagênica observada nas amostras de "pool" de inverno para a linhagem TA98 pode ser explicada por possíveis efeitos antagônicos entre os compostos presentes na amostra, uma vez que os "pools" são constituídos de 12 a 15 amostras individuais coletadas semanalmente, durante os três meses de cada estação do ano, com valores de partículas totais em suspensão bastante diferentes.

IWADO *et al.* (1991) demonstraram que extratos orgânicos de material particulado de ar, obtidos em metanol, procedentes da área suburbana da cidade de Okayama, no Japão, apresentavam não apenas atividade mutagênica, mas também, atividade antimutagênica no teste de Ames. Os agentes mutagênicos foram extraídos das amostras por "cotton-blue", e os fatores antimutagênicos foram identificados como ácidos graxos de cadeia longa: ácidos

palmítics, esteáricos, oléicos e linoleicos, muitos deles ubiqüitários das partículas atmosféricas.

SIDEROPOULOS & SPECH (1994), estudando efeitos sinérgicos e antagônicos em misturas complexas de material particulado de ar, observaram que a atividade mutagênica do benzo(a)pireno (2 µg/placa) e 2-aminoantraceno (1,5 µg/placa) era significativamente inibida por extratos mutagênicos e não mutagênicos de material particulado de ar (400 µg/placa).

GRIFFOL *et al.*, em 1990, já haviam demonstrado que a interação entre os componentes de extratos orgânicos de material particulado de sedimento levava a uma redução da atividade mutagênica da fração total da amostra. Esses autores observaram que a mutagenicidade do 3-metilcolantreno e 2-nitrofluoreno foi reduzida em 50% e 30%, respectivamente, na presença de extratos orgânicos de sedimento, demonstrando que essa interação está relacionada com as propriedades químicas específicas do agente mutagênico.

Em relação às amostras "H", os maiores índices de mutagenicidade por volume de ar foram observados nos meses mais frios, ou seja, agosto, para o Parque D. Pedro e Vila Parisi, e setembro, para Pinheiros. No mês de março foram detectados os índices mais baixos de mutagenicidade direta e indireta nas três áreas estudadas. É interessante observar que, em Vila Parisi, a mutagenicidade específica por massa de amostra apresentou baixa variação durante o ano de estudo, e que a amostra do mês de dezembro foi a de maior potência mutagênica, podendo explicar os índices mais elevados de mutagenicidade no "pool" de verão.

Os dados obtidos para as amostras "H" corroboram a hipótese de interação dos compostos presentes nos extratos orgânicos de material particulado de ar, e sugerem que, para os estudos de quantificação de resposta, deve-se dar preferência para trabalhar com amostras individuais, para se evitar os possíveis efeitos antagônicos e sinérgicos que podem ocorrer com os compostos presentes nas diferentes amostras. Entretanto, em estudos para a avaliação de diferentes métodos, a utilização de "pools" de amostra é necessária para se obter extrato orgânico suficiente para testar todos métodos.

3.9.4. AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES ENSAIOS UTILIZADOS NA CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DE MATERIAL PARTICULADO DE AR

O teste de Ames é, sem dúvida, um instrumento de grande importância no estudo da mutagenicidade de misturas complexas. Entretanto, quando se trabalha com amostras ambientais muitas vezes o volume ou massa do extrato orgânico é muito pequeno e apenas pequenas doses podem ser testadas, sendo necessário um ensaio de mutagenicidade mais sensível que esse ensaio convencional. O teste de Kado ou ensaio de microssuspensão, inicialmente desenvolvido para detecção de mutágenos em urina humana, veio preencher essa necessidade e tem encontrado grande aplicabilidade na avaliação do potencial mutagênico de amostras ambientais, principalmente as atmosféricas (AGURELL & STENSMAN, 1992; BAGLEY *et al.*, 1992; KADO *et al.*, 1986; 1992; LOFROTH, 1990; SCHEEPERS *et al.*, 1995) possibilitando testar um número maior de linhagens de *S. typhimurium* sob condições de presença e ausência de metabolização.

A comparação dos resultados obtidos no teste de Ames e Kado confirmou a maior sensibilidade desse último ensaio para a quase totalidade das amostras analisadas, e demonstrou que essa sensibilidade varia de acordo com a amostra, linhagem e condição de ativação metabólica (Tabela 18). A análise dos dados de CME em m³ obtidos para os diferentes métodos (Tabela 19) mostrou que, em geral, o teste de Kado detectou mutagenicidade em concentrações cinco vezes inferiores ao teste de Ames, concordando com os dados da literatura, que registram um fator de aumento da sensibilidade do teste de 3 a 10 vezes para amostras de material particulado de ar (AGURELL & STENSMAN, 1992; KADO *et al.*, 1986; LOFROTH, 1990)

Com relação aos compostos químicos, AGURELL & STENSMAN (1992) e KADO *et al.* (1986), observaram que este ensaio de microssuspensão detectou um aumento de atividade de 11 a 14 vezes para o benzo(a)pireno, na presença de ativação metabólica, de 31 vezes para o nitrofluoreno e 37 para o 1-nitropireno, na ausência de fração S9. Os compostos 2-aminoantraceno e 4-nitroquinolina, utilizados como controles positivos durante este estudo, apresentaram um aumento de atividade de 5 e 11 vezes, respectivamente.

Os extratos orgânicos analisados no presente estudo apresentaram maior sensibilidade no teste de Kado quando testados frente à linhagem TA98 na ausência de ativação metabólica (8 vezes) e apresentaram excelente correlação com o teste de Ames (Figura 29). Estes dados confrontados com relatos da literatura acima confirmam a presença de mutágenos diretos, como os nitroarenos, na atmosfera das áreas estudadas.

A maior sensibilidade do teste de Kado está associada ao fato do ensaio empregar um número maior de células bacterianas e um período de pré-incubação (90 minutos), o qual permite um contato mais direto da amostra com a linhagem bacteriana e o sistema de metabolização. Isto reduz a possibilidade de ligações não específicas do mutágeno ativo ao ágar, e permite que a bactéria seja exposta a uma concentração maior do composto mutagênico, devido ao baixo fator de diluição envolvido. Por outro lado, assim como o contato mais direto com o sistema de ativação metabólica pode aumentar a sensibilidade dos promutágenos, pode também reduzir a mutagenicidade daqueles compostos de ação mutagênica direta que são detoxificados por essas enzimas, o que pode explicar a menor sensibilidade do teste de Kado quando o ensaio foi realizado com ativação metabólica, quando comparado com os ensaios sem ativação enzimática.

Apesar da maior sensibilidade do teste de Kado, é necessário uma melhor validação do mesmo para seu uso de rotina no monitoramento da mutagenicidade do ar. A utilização de volumes muito pequenos e a maior dificuldade de se padronizar o inóculo de células bacterianas, parecem interferir na reprodutibilidade do ensaio.

O ensaio de mutação direta em *S. typhimurium* TM677 ("microforward") foi selecionado para esse estudo por medir uma mutação direta, ao invés de mutação reversa, como os outros dois testes selecionados, além de permitir o cálculo da frequência de mutantes por unidade de massa ou volume da amostra. Outra vantagem deste teste é que, por se tratar de um microensaio, requer apenas pequenas quantidades da amostra para teste.

LEWTAS *et al.* (1987) utilizaram o ensaio "microforward" para avaliar a mutagenicidade de partículas de ar atmosférico de residências em Columbus, Ohio, e verificaram que os maiores índices de mutagenicidade foram observados nas cozinhas das residências com a frequência de mutação oscilando entre 21,4 a 100×10^{-5} por mg de extrato orgânico, na presença de S9. A frequência de mutação para a atmosfera, próximo às residências, variou de 121 a 425×10^{-5} por mg. A comparação entre os resultados obtidos no teste de Ames e no ensaio "microforward", utilizando as curvas dose-resposta das razões de mutagenicidade obtidas em cada ensaio, mostraram que, o ensaio de mutação direta requer, em geral, um décimo do volume necessário para o teste de Ames para detectar a mutagenicidade dessas amostras.

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram valores mais elevados de frequência de mutação do que o detectado em Columbus, variando de 50 a 3160 mutantes $\times 10^{-5}$ bactérias por mg de extrato orgânico. A maior frequência de mutação foi obtida no "pool" de outono do Parque D. Pedro na presença de ativação metabólica, indicando a presença de compostos do tipo PAHs e confirma os dados obtidos no teste de

Ames para esta estação onde foi observada também uma resposta significativa para a linhagem TA100 na presença de S9.

BUSBY *et al.* (1994), avaliando a mutagenicidade de mono e dinitropirenos frente ao ensaio de mutação direta em *S. typhimurium* TM677, observaram que o 2-nitropireno (2NP), relatado na literatura como um potente mutágeno para os ensaios de mutação reversa, na ausência de ativação metabólica, foi inativo no ensaio "microforward" na ausência de S9, embora apresentasse mutagenicidade na presença de ativação enzimática. Com exceção do 2-NP, todos os nitropirenos foram mais mutagênicos na ausência de S9, sendo a maior diferença observada com os dinitropirenos, os quais foram três ordens de magnitude mais potentes na ausência de ativação metabólica.

A análise das curvas dose-resposta do ensaio de mutação direta mostra que, para os "pools" de primavera e verão, a frequência de mutantes foi significativamente mais elevada na ausência de ativação metabólica, indicando a possível presença de dinitropirenos, o que corrobora os dados obtidos com as linhagens nitroreduases deficientes no teste de Ames.

Os testes baseados na função SOS tais como o Cromoteste e Induteste têm sido empregados com relativa frequência na avaliação de extratos de material particulado de ar. Dado o princípio dos ensaios baseados nas funções SOS, a sensibilidade desses deveria ser muito maior do que aqueles que detectam mutação/reversão, pois são capazes de detectar a ocorrência da lesão no próprio DNA, antes da ocorrência da mutação. No entanto, os resultados obtidos nesse trabalho contrapõe-se a essa hipótese, principalmente em relação ao Cromoteste.

Os resultados deste trabalho mostram uma sensibilidade ligeiramente mais baixa do SOS Cromoteste em relação ao teste de Ames. Apesar do trabalho de MERSCH-SUNDERMAN *et al.* (1991) mostrar sensibilidade similar ao teste de Ames para 24 diferentes tipos de PAHs. NYLUND *et al.* (1992) trabalhando com extrato de material particulado de diesel encontraram boa correlação entre a atividade detectada pela linhagem TA100 de *S. typhimurium* e o SOS Cromoteste, mas não com a linhagem TA98. Tal observação já havia sido feita por HUDE *et al.* (1988, *apud* NYLUND *et al.*, 1992). Esses resultados poderiam explicar a menor sensibilidade observada nas amostras testadas nesse trabalho, tendo em vista que os resultados do teste de Ames mostram que a linhagem TA98 sempre teve maior sensibilidade de resposta.

MIGUEL *et al.* (1990) empregaram o teste de Ames e o Induteste para avaliação da genotoxicidade de amostras atmosféricas do Rio de Janeiro, em Camdem, NJ e Caldecott Tunnel, Ca., nos Estados Unidos. A mutagenicidade predominante para o teste de Ames foi preferencialmente encontrada na fração apolar do extrato, obtida em ciclohexano. Já a maioria da atividade genotóxica para o Induteste foi encontrada na fração polar obtida com

acetona. Essa diferença na resposta não poderia explicar as diferentes sensibilidades obtidas neste trabalho, pois utilizamos um único extrato obtido com diclorometano e mesmo assim o Induteste parece ser mais sensível. Devido porém ao pequeno número de amostras onde foi possível comparar os dois ensaios, recomenda-se mais testes para se afirmar sobre a maior sensibilidade do Induteste em relação ao teste de Ames. No caso do Induteste, um dos maiores problemas na análise de extratos orgânicos é a impossibilidade de usar dimetilsulfóxido, pois o mesmo é tóxico para as linhagens utilizadas no ensaio. Dessa forma, usou-se como alternativa a acetona em concentrações máximas de 6,7% (ROSSMAN *et al.*, 1985), gerando também mais uma diferença entre as condições testadas.

Outro problema com o Cromoteste e Induteste foi o estabelecimento da parte linear da curva dose-resposta. Os próprios controles negativos apresentaram grande variação tornando impreciso o cálculo de potência de muitas das amostras (Figuras 23 a 28). Além disso, as doses empregadas inicialmente, muitas vezes não foram adequadas e como não havia mais material orgânico extraído, não foi possível a repetição desses ensaios com outras doses.

Embora esses ensaios sejam valiosos em algumas aplicações, tais como: detecção de metais e agentes que causam quebra na cadeia de DNA, neste estudo não contribuíram com informações adicionais sobre a mutagenicidade presente nas amostras de material particulado de ar testadas. Visto a importância desses ensaios nas aplicações supracitadas, são necessárias modificações nas metodologias utilizadas com o intuito de diminuir as variações observadas e permitir seu possível uso em aplicações rotineiras.

3.9.5. NÍVEIS DE MUTAGENICIDADE DAS AMOSTRAS "H" E COMPARAÇÃO COM OUTROS ESTUDOS

As amostras que apresentaram a maior concentração mensal de partículas totais em suspensão (PTS), foram analisadas quanto à mutagenicidade, com a finalidade de se avaliar este efeito biológico em condições críticas de poluição em termos de PTS.

Os valores de mutagenicidade específica para a linhagem TA98 (na presença e ausência de S9) variaram de 0,78 a 5,37 revertentes/ μg e estão de acordo com os dados da literatura que relatam uma variação de 0,01 à 8,2 revertentes/ μg em material particulado de ar para essa linhagem (DeMARINI & LEWTAS, 1995; LOUIS *et al.*, 1987). As concentrações de extrato orgânico (DCM) de ar mostraram uma correlação positiva com os índices de mutagenicidade direta e indireta (Tabela 11). Correlação similar foi encontrada por LEE *et al.* (1994) em amostras de partículas atmosféricas de Taiwan.

Embora, em geral, a fração S9 não alterou a atividade mutagênica das amostras, os promutágenos parecem ser responsáveis pelos níveis mais elevados de mutagenicidade detectados em Cubatão, no mês de dezembro. As menores respostas mutagênicas obtidas no presente estudo, na presença de atividade metabólica, para as amostras "pool" e "H" diferem dos dados da literatura que mostram níveis elevados de mutagenicidade na presença de S9 (ADONIS & GIL, 1993; BARALE *et al.*, 1989; DeFLORA *et al.*, 1989; FLESSEL *et al.*, 1991; LEE *et al.*, 1994; LOUIS *et al.*, 1987; PITTS *et al.*, 1982; TALCOTT & WEI, 1977). Essas diferenças podem ser explicadas por condições únicas do nosso país tais como: elevada radiação solar que origina mais mutágenos derivados de PAHs de ação direta, características específicas dos combustíveis (álcool e "gasoálcool"), não utilização de carvão para aquecimento residencial, entre outras.

Os resultados obtidos mostram que a mutagenicidade detectada nas amostras de extratos orgânicos procedentes do Parque Dom Pedro foi significativamente mais elevada do que a dos extratos das amostras de Pinheiros e Vila Parisi, principalmente nos meses de agosto a outubro. Esses resultados são explicáveis, uma vez que o local de amostragem do Parque Dom Pedro está localizado em corredor de tráfego e próximo a um terminal de ônibus na zona central da cidade, sendo bastante influenciado pelas emissões veiculares (álcool, "gasoálcool" e diesel) que contribuem para 38% das partículas totais em suspensão nessa área (ALONSO *et al.*, 1992).

Dois picos de mutagenicidade, um em junho (TA98+S9) e outro em setembro (TA98-S9), foram observados nos extratos orgânicos de Pinheiros. Durante os demais meses os índices de mutagenicidade variaram de 8,8 a 31,1 revertentes/m³. Apesar dessa área ser considerada residencial, está muito próxima da Av. das Nações Unidas (Marginal de Pinheiros), a qual dá acesso a várias rodovias interestaduais, estando sob a influência das emissões de veículos leves e pesados, que podem estar contribuindo para a mutagenicidade dessas amostras.

Os menores índices de mutagenicidade foram observados em Vila Parisi, onde em 70% dos meses, a atividade mutagênica foi inferior a 13 revertentes/m³ e os valores máximos não ultrapassaram 33,4 revertentes/m³. Em Vila Parisi, Cubatão, os valores de PTS foram elevados durante todo o período de estudo de estudo, mas as concentrações de MOE por m³ foi baixa, o que pode explicar os baixos níveis de mutagenicidade detectados. As partículas totais em suspensão dessa área industrial estão mais associadas com poluentes inorgânicos tais como cimento e sulfato de amônio (MARTINS *et al.*, 1993). É também importante considerar que as descargas das indústrias ocorrem a níveis mais elevados e usualmente são dispersadas antes de atingir o receptor. Estudos futuros deverão ser conduzidos nas regiões de Cubatão sob a influência mais direta das indústrias

petroquímicas com a finalidade de se comparar as concentrações de MOE e resposta mutagênica com as obtidas no presente estudo.

Os índices de mutagenicidade por volume de ar apresentaram uma correlação positiva com as concentrações de PTS, e os maiores níveis de significância foram encontrados para os extratos orgânicos do Parque Dom Pedro (Tabela 11). LEE *et al.* (1994), em estudo similar observaram também correlação entre mutagenicidade e concentrações de PTS, mas os valores de r foram inferiores (0,37-0,50; $p < 0,05$) do que os obtidos no presente estudo (0,65-0,92; $p < 0,05$).

Comparação da atividade mutagênica de extratos orgânicos de material particulado de ar procedentes de áreas urbanas, industriais e rurais de diferentes regiões do mundo tem sido relatada por vários autores (BARALE *et al.*, 1989; LEE *et al.*, 1994; LOUIS *et al.*, 1987), e mostram que os índices de mutagenicidade variam de 1 a 288 revertentes/m³ para a linhagem TA98 -S9, e de 1 a 690 revertentes/m³, na presença de ativação metabólica. Entre as cidades com os maiores índices de mutagenicidade direta e indireta são citadas Paris, 62-100 rev/m³ respectivamente (COURTOIS *et al.*, 1985); Oslo, 55-180 rev/m³ (ALFHEIM *et al.*, 1983); Ohmuta, 44-445 rev/m³ (TOKIWA *et al.*, 1977); Los Angeles, 140 rev/m³ (LOUIS *et al.*, 1987; PITTS *et al.*, 1982); e Santiago do Chile, 287-1177 rev/m³ (ADONIS & GIL, 1993; TOKIWA *et al.*, 1983). As variações de atividade mutagênica de um estudo para outro são principalmente atribuídas às diferenças nos tipos e quantidade das fontes poluidoras, período de amostragem e condições climáticas, embora as diferenças metodológicas, principalmente nos processos de extração, devam também ser consideradas.

Os níveis de mutagenicidade observados nas amostras do Parque D. Pedro, nos meses de agosto (94-246 rev/m³) e setembro (106-120 rev/m³), foram similares aos detectados nos meses frios nas grandes cidades relatadas acima. É importante notar que nas amostras de PDP os valores mais altos foram observados na ausência de ativação metabólica (mutágenos de ação direta), enquanto que em outros países a resposta mutagênica foi mais elevada na presença de S9 (promutágenos). SHIMADA & GUENGERICH (1990) relataram que o 1,3-dinitropireno, potente mutágeno e carcinógeno ambiental de ação direta, é metabolicamente desativado pelos microsossomos de fígado humano e de rato contendo citocromos P450IA1 e P450IA2. Esta redução da mutagenicidade direta foi observada nas amostras do Parque Dom Pedro e Pinheiros coletadas em agosto e setembro respectivamente, quando o ensaio foi realizado na presença de fração S9.

Em Pinheiros, os maiores índices de mutagenicidade (98-89 rev/m³) estiveram próximos aos detectados em Paris (COURTOIS *et al.*, 1985), e em Vila Parisi, Cubatão, a atividade mutagênica (31-33 rev/m³) esteve dentro da faixa de variação observada para

áreas suburbanas e urbanas não industrializadas (1-38 rev/m³) (LOUIS *et al.*, 1987). Resultados similares foram relatados por TAKEDA *et al.* (1984), na área industrial de Amagasaki, no Japão.

Embora atividade mutagênica tenha sido observada em todas amostras analisadas, é difícil determinar as possíveis conseqüências desses resultados de mutagenicidade na saúde humana. Os fatores que complicam a extrapolação desses resultados para os riscos em humanos são: (a) a biodisponibilidade dos componentes mutagênicos absorvidos ao material particulado de ar; (b) possíveis divergências entre os ensaios *in vivo* e *in vitro*; (c) possíveis interações sinérgicas e antagônicas entre os componentes dessa mistura complexa adsorvida ao material particulado; e (d) interação com receptores biológicos tais como o sistema monooxigenase P450. Entretanto, os nossos resultados demonstraram índices elevados de mutagenicidade, principalmente para as amostras sob influência de poluição veicular. Considerando que um indivíduo respira 15m³/dia, todas as amostras de "pool" de PDP seriam capazes de elicitar uma resposta mutagênica no teste de Ames em um período inferior a 12 horas (CME < 8,01 m³), sendo que na primavera apenas 0,36 m³ de volume de ar respirado em 35 minutos seriam capazes de induzir uma resposta mutagênica. Na situação mais crítica de poluição para PTS, observada no mês de agosto, no Parque D. Pedro, verifica-se que compostos orgânicos tais como PAHs e nitropirenos contidos em um volume de 0,15 m³ de ar poluído, o qual é respirado em aproximadamente 14 minutos por uma pessoa em trânsito na área central de São Paulo, produz uma resposta mutagênica frente à linhagem TA98 no teste de Ames.

Essa extrapolação de riscos dos bioensaios para a saúde humana tem sido uma preocupação crescente para a maioria dos pesquisadores que têm trabalhado com genotoxicidade em misturas complexas, e nos últimos anos muitos esforços têm sido aplicados no desenvolvimento de procedimentos de avaliação de riscos para misturas complexas tais como despejos industriais, emissões veiculares, ar urbano, águas superficiais e de consumo, entre outras (DeMARINI & LEWTAS, 1995; HOUK & WATERS, 1996; LEWTAS *et al.*, 1993). Nesse sentido, alguns modelos qualitativos para compostos químicos e amostras ambientais foram estabelecidos (CLAXTON *et al.*, 1991a, b; HOUK, 1992). Um exemplo desse tipo de análise é o modelo descrito por HOUK (1992) para efluentes industriais, o qual estabelece diferentes classes de potência mutagênica (baixa, moderada, alta e extrema) por massa(mg) ou volume (L) de amostra para o teste de Ames. As potências de mutagenicidade são então combinadas com as taxas de emissão para se calcular o impacto da carga mutagênica diária no meio ambiente. Através da utilização de dados da literatura sobre a variação da potência mutagênica de outras misturas complexas, HOUK (1992) estabeleceu uma comparação de riscos entre diferentes amostras

ambientais. De acordo com essa classificação, o risco relativo da mutagenicidade detectada no ar de São Paulo e Vila Parisi é considerado de potência moderada (10^2 a 10^4 revertentes/ μg) quando comparado com a mutagenicidade de outras misturas complexas. Esta potência é similar à encontrada para águas de consumo, águas de lago, emissões veiculares (gasolina), mas inferior à potência mutagênica de águas de rios, emissões de incineradores e descargas industriais. Entretanto, é sempre importante se considerar o período de exposição diário para se estimar o risco ao ser humano devido a essas fontes de poluição. Por outro lado, se considerarmos o critério de avaliação estabelecido para compostos químicos puros, os extratos orgânicos de material particulado de ar dos três pontos amostrados seriam considerados de potência baixa (1-10 rev/ μg). As análises de seqüência do DNA das mutações induzidas por extratos orgânicos procedentes de emissões de processos de combustão e ar urbano em *Salmonella* (teste de Ames) sugerem que cada classe de mistura complexa induz um único padrão de mutação, e que cada padrão é consequência da predominância de uma classe ou classes particulares no extrato (DeMARINI & LEWTAS, 1995). Atualmente já se conhece os espectros de mutação de vários compostos químicos mutagênicos e cancerígenos, os quais podem ser comparados com as mutações induzidas pelas misturas complexas. DeMARINI *et al.* (1994) compararam os espectras de mutação de extratos orgânicos de material particulado de ar com os espectros de mutação do benzo(a)pireno e observaram padrões de mutação muito similares entre a amostra ambiental e o composto químico puro tanto para linhagem TA98 como para a linhagem TA100. Comparação dos espectras de mutação de amostras complexas em sistemas bacterianos e sistemas celulares superiores podem se constituir também um instrumento na avaliação de risco dessas misturas complexas à saúde humana.

CETESB

3.10. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Os bioensaios utilizados neste estudo mostraram-se de grande sensibilidade na detecção da mutagenicidade de poluentes atmosféricos, podendo ser empregados como instrumento eficaz no rastreamento, localização e detecção de poluentes orgânicos atmosféricos com potencial cancerígeno.
- Verificou-se a presença de atividade mutagênica nos extratos orgânicos de material particulado de ar das amostras procedentes do Parque Dom Pedro (PPD), Pinheiros (PIN) e Vila Parisi, Cubatão (CP) coletadas durante o período de junho de 1990 a maio de 1991. A potência das amostras analisadas através do teste de Ames variou de 10^2 a 10^4 revertentes/mg de material orgânico extraído, potencial mutagênico este considerado de risco moderado quando comparado com outras misturas complexas, tais como água de consumo e emissões veiculares.
- Os maiores níveis de mutagenicidade foram observados nas áreas urbanas da cidade de São Paulo, principalmente no Parque Dom Pedro ($12 - 246$ revertentes/ m^3), onde a poluição atmosférica é bastante influenciada pela emissão de veículos automotores. Esses índices foram similares ao dos grandes centros urbanos de outros países (Paris, Oslo, Los Angeles, e Santiago do Chile). A área industrial de Vila Parisi, Cubatão, foi a que apresentou menores concentrações de material orgânico extraído e menores índices de mutagenicidade ($5 - 33$ revertentes/ m^3), resultado associado a características específicas da área, onde as principais fontes de material particulado são o sulfato de amônio, cimento e poeira de rua.
- Foi observada uma variação sazonal da mutagenicidade detectada, com maiores valores registrados nos meses de agosto de 1990 na estação Parque Dom Pedro e Vila Parisi (Cubatão) e setembro do mesmo ano na estação Pinheiros para as amostras mensais com maior quantidade de partículas totais em suspensão testadas durante o período de estudo.

- Os dados obtidos para as linhagens de *S.typhimurium* nitroreductase deficientes e no teste de mutação direta são indicativos de que os compostos mono e dinitroarenos são responsáveis por parte significativa da mutagenicidade detectada, especialmente nas amostras coletadas durante a primavera e verão.
- Aldeídos mutagênicos (formaldeído, aldeídos de cadeia longa) podem estar presentes nas amostras estudadas, devido aos resultados positivos para a linhagem que detecta preferencialmente este tipo de compostos. Um estudo mais detalhado para se avaliar a contribuição das emissões dos carros a álcool e "gasoálcool" na mutagenicidade detectada deveria ser conduzido, considerando-se o papel estratégico que esses tipos de combustíveis tiveram na redução da poluição atmosférica no Brasil.
- Estudos futuros devem ser realizados para se identificar os compostos orgânicos presentes nessas amostras de material particulado e para se caracterizar o espectra de mutação dos extratos orgânicos, com o objetivo de fornecer subsídios para futura avaliação de risco de exposição humana a essas misturas complexas.
- Em relação aos métodos avaliados e implantados, podemos concluir que o teste de Ames é ainda a melhor metodologia para avaliar a mutagenicidade de amostras de material particulado de ar, seguido do teste de Kado, que embora mais sensível apresenta menor reprodutibilidade. Os testes de mutação direta e aqueles baseados na função SOS têm sua aplicação restrita a estudos especiais.

CETESB

Baseados nas conclusões acima citadas pode-se recomendar:

- Que sejam intensificadas ações de controle nas fontes de contaminantes com atividade mutagênica, especialmente as emissões veiculares, para minimizar e prevenir os danos que estes poluentes podem causar à saúde das populações expostas.
- Que o teste de Ames seja incluído como mais um parâmetro a ser utilizado no monitoramento da qualidade do ar, tanto na caracterização da mutagenicidade de poluentes atmosféricos como na identificação de fontes poluidoras. Este teste pode ser especialmente útil em situações críticas ou quando se deseja avaliar a eficiência de medidas de controle quanto a redução da poluição veicular ou industrial. Quando a quantidade de material particulado coletado for muito pequena (partículas inaláveis por ex.) utilizar o teste de Kado em substituição ao teste de Ames.
- Testar as amostras que apresentarem o maior PTS (partículas totais em suspensão) do mês frente ao teste de Ames com a linhagem TA98 com e sem ativação metabólica continuamente, coletadas nas 3 estações estudadas ou outras que por ventura se tornarem representativas, para manutenção de dados históricos em relação a quantidade de material orgânico com atividade mutagênica presente nesses locais.
- Sejam efetuadas análises químicas para quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e nitroarenos nas amostras com maiores índices de mutagenicidade para se avaliar a contribuição destes na genotoxicidade detectada, bem como analisar o espectro de mutação que essas amostras causam frente as linhages de *S. typhimurium*, visando fornecer subsídios para futura avaliação de risco da exposição humana a essas misturas complexas.

3.11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADONIS M. & GIL, L. Mutagenicity of organic extracts from Santiago (Chile) airborne particulate matter. *Mutat. Res.*, **292**: 51-61, 1993.
- AGURELL, E & STENSMAN, C. *Salmonella* mutagenicity of three complex mixtures assayed with the micro-suspension technique A WHO/IPCS/CSCM study. *Mutat. Res.*, **276**: 87-92, 1992.
- ALFHEIM, I.; LÖFROTH, G.; MOLLER, M. Bioassay of extracts of ambient particulate matter. *Environ. Health Perspect.*, **47**: 227-38, 1983.
- ALINK, G.M.; SMIT, H.A.; VANHOUDT, J.J.; KOLKMAN, J.R.; BOLEIJ, J.S. Mutagenic activity of airborne particulates at non-industrial locations. *Mutat. Res.*, **116**: 21-34, 1983.
- ALONSO, C.D. **Levels of particulate carbonaceous material in São Paulo - Brasil. An historical data base.** Chapel Hill, N.C., USA, 1989 (Tese de Mestrado - Environmental Science and Engineering Department of North Carolina University).
- ALONSO, C.D.; MARTINS, M.H.R.B.; ROMANO, J.; GODINHO, R. Understanding the air pollution problem in São Paulo metropolitan area by receptor model. *In: World Air Clean Congress*, 9., Montreal, Canada, 1992.
- AMES, B.N.; DURSTON, W.E.; YAMASAKI, E.; LEE F.D. Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenate for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 2281-85, 1973.
- AMES, B.N.; McCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detection carcinogens and mutagens with the *Samonella*/mammalian microsomes mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **31**: 347-64, 1975.
- BAGLEY, S.T.; STOLTZ, S.L.; BECKER, D.M.; KEEN, R.E. Characterization of organic extracts from standard reference materials 1649, "urban dust/organics", and 1650, "diesel particulate matter", using a micro-suspension assay. A WHO/IPCS/CSCM study. *Mutat. Res.*, **276**: 81-6, 1992.

- BARALE, R.; ZUCCONI, D.; GIORELLI, F.; CARDUCCI, A.L.; TONELLI, M.; LOPRIENO, N. Mutagenicity of airborne particles from a non industrial town in Italy. *Environ. Mol. Mutagen.*, **13**: 227-33, 1989.
- BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; McCANN, J.; PIKE, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat. Res.*, **97**: 267-281, 1982.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução No 03 de 28 de junho de 1990. Estabelece os padrões de Qualidade do Ar.
- BRUSICK, D. Evaluation of chronic rodent bioassays and Ames assay tests as accurate models for predicting human carcinogens. In: MILLMAN, H.A. ed. **Application of Biological Markers to Carcinogenicity Testing**. New York, Plenum Press, 1983. p. 153-63
- BRUSICK, D.J. & YOUNG, R.R. **IERL-RTP Procedures manual: Level 1 Environmental assessment biological tests**, Washington, U.S. EPA, 1981, 138p. (EPA 600/8-81-0204)
- BUSBY, J.R., WILLIAM, F.; SMITH, H.; BISHOP, W.W.; THILLY, W.G. Mutagenicity of mono- and dinitropyrenes in the *Salmonella typhimurium* TM677 forward mutation assay. *Mutat. Res.*, **322**: 221-32, 1994.
- BUTLER, J.P.; KNEIP, T.J.; MUKAI, F.; DAISEY, J.M: Interurban variations in the mutagenic activity of the ambient aerosol and their relations to fuel use patterns. In: WATERS, M.D.; SANDHU, S.S.; LEWTAS, J.; CLAXTON, L.D.; STRAUSS, G.; NESNOW, S. eds. **Short term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures IV**. New York, Plenum Press, 1985. p. 233-46.
- BUTLER, J.P.; KNEIP, T.J.; DAISEY, J.M. An investigation of interurban variations in the chemical composition and mutagenic activity of airborne particulate organic matter using an integrated chemical class/bioassay system. *Atmos. Environ.*, **21**: 883-92, 1987.
- CETESB, São Paulo. Teste de Kado - Ensaio de microssuspensão com *Salmonella typhimurium*. **Norma Técnica L5.241**, São Paulo, 1991a. 42p.

- CETESB, São Paulo. **Relatório da Qualidade do ar no Estado de São Paulo - 1990**. São Paulo, 1991b, 125p.
- CETESB, São Paulo. **Relatório da Qualidade do ar no Estado de São Paulo - 1991**. São Paulo, 1992, 127 p.
- CETESB, São Paulo. . Mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* Teste de Ames. **Norma Técnica L5.620**, São Paulo, 1993. 38p.
- CHRISP, C.E. & FISHER, G.L. Mutagenicity of airborne particles. **Mutat. Res.**, **76**: 143-64, 1980.
- CLAXTON, L.D. Characterization of automotive emissions by bacterial mutagenesis bioassay: A review. **Environ. Mutagen.**, **5**: 609-31, 1983.
- CLAXTON, L.D.; STEAD, A.G.; WALSH, D. An analysis by chemical class of *Salmonella* mutagenicity tests as predictors of animal carcinogenicity. **Mutat. Res.**, **205**: 197-225, 1988.
- CLAXTON, L.D.; KLEINDIENST, T.E.; PERRY, E.; CUPITT, L.T. Assessment of the mutagenicity of volatile organic air pollutants before and after atmospheric transformation. In: Waters, M.D. *et alli* eds. **Genetic Toxicology of Complex Mixtures**, New York, Plenum Press, 1990. p. 103-11.
- CLAXTON, L.D.; HOUK, V.S.; MONTEITH, L.G.; MYERS, L.E.; HUGHES, T.J. Assessing the use of known mutagens to calibrate the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay: I. Without exogenous activation. **Mutat. Res.**, **253**: 137-47, 1991a.
- CLAXTON, L.D.; HOUK, V.S.; MONTEITH, L.G.; MYERS, L.E.; HUGHES, T.J. Assessing the use of known mutagens to calibrate the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay: I. With exogenous activation. **Mutat. Res.**, **253**: 149-59, 1991b.
- CLAXTON, L.D.; CREASON, J.; LEROUX, B.; AGURELL, E.; BAGLEY, S; BRYANT, D.W.; COURTOIS, Y.A.; DOUGLAS, G.; CLARE, C.B.; GOTO, S; QUILLARDET, P.; JAGANNATH, D.R.; KATAOKA, K.; MOHN, G.; NIELSEN, P.A.; ONG, T.; PEDERSON, T.C.; SHIMIZU, H. NYLUND, L.; TOKIWA, H.; VINK, G.J.; WANG, Y.; WARSHAWSKY, D. Results of the IPCS collaborative study in complex mixtures. **Mutat. Res.**, **276**: 23-32, 1992.

- COMMONER, B.; MADYASTHA, P.; BRONSDON, A.; VITHAYATHIL, A.J. Environmental mutagens in urban air particles. **J. Toxicol. Environ. Health**, **4**: 59-77, 1978.
- COURTOIS, Y.A. Genotoxicité des particules atmospheriques en suspension un zone urbaine - Contribution au choix de tests de genotoxicité *in vitro* pour l'étude de la pollution atmosphérique. Tese de Doutoramento, Université Paris (R. Descartes), 1984, 97p.
- COURTOIS, Y.A.; MIN, S.; LACHENAL, C.; JACQUOT-DESCHAMPS, J.M.; CALLAIS, F.; FESTY, B. Genotoxicity of organic extracts from atmospheric particles. *In: International Conference on "Occupational and Environmental Significance of Industrial Carcinogens"*, Bologna, October 1985.
- CREBELI, R.; FUSELLI, S.; MENEGUZ, A.; AQUILINA, G.; CONTI, L.; LEOPARDI, P.; ZIJNO, A.; BARIS, F.; CARERE, A. *In vitro* and *in vivo* mutagenicity studies with airborne particulate extracts. **Mutat. Res.**, **204**: 565-75, 1988.
- DAISEY, J.M.; KNEIP, T.J.; HAWRYLUK, I.; MUKAI, F. Seasonal variations in the bacterial mutagenicity of airborne particulate organic matter in New York City. **Environ. Sci. Technol.**, **14**:1487-90, 1980.
- De FLORA, S.; BAGNASCO, M.; IZZOTTI, A.; AGOSTINI, F.D.; PALA, M.; VALERIO, F. Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbon fractions extracted from urban air particulates. **Mutat. Res.**, **224**: 305-18, 1989.
- De RAAT, W.K. Genotoxicity of aerosol extracts. Some methodological aspects and the contribution of urban and industrial locations. **Mutat. Res.**, **116**: 47-83, 1983.
- De RAAT, W.K. Polycyclic aromatic hydrocarbons and mutagens in ambient air particles. **Toxicol. Environ. Chem.**, **16**: 259-79, 1988.
- De RAAT, W.K. & De MEIJERE, F.A. The mutagenicity of ambient air particles from local traffic and distant sources during episodes with moderate photochemical air pollution. **Sci. Total Environ.**, **44**: 17-33, 1988.
- DeMARINI, D., DALLAS, M.D.; LEWTAS, J. Cytotoxicity and effect on mutagenicity of buffers in a microsuspension assay. **Terat. Carcinon. Mutagen.**, **9**: 287-95, 1989.

- DeMARINI, D.M.; BROOKS, H.G.; PARKES, D.G. Jr. Induction of prophage lambda by chlorophenols. **Environ. Mol. Mutagen.**, **15**: 1-9, 1990.
- DeMARINI, D.M.; SHELTON, M.L.; BELL, D.A. Mutation spectra in *Salmonella* of complex mixtures: Comparison of urban air to benzo[a]pyrene. **Environ. Mol. Mut.**, **24**: 262-75, 1994.
- DeMARINI, D. & LEWTAS, J. Mutagenicity and carcinogenicity of complex combustion emissions: emerging molecular data to improve risk assessment. **Toxicol. Environ. Chem.**, **49**: 157-66, 1995.
- ELESPURU, R.K. & YARMOLINSKY, M.B. A colorimetric assay of lysogenic induction designed for screening potential carcinogenic and carcinostatic agents. **Environ. Mutagen.**, **1**: 65-78, 1979.
- EPSTEIN, S.S.; JOSHI, S.; MANTEL, A.N.; SAWICKI, E.; STANLEY, T.; TABOR, E. Carcinogenicity of organic particulate pollutants in urban air after administration of trace quantities to neonatal mice. **Nature**, **212**: 1305-07, 1966.
- ESPINOSA-AGUIRRE, J.J.; REYES, R.E.; RUBIO, J.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; MARTINEZ, G. M. Mutagenic activity of urban air samples and its modulation by chili extracts. **Mutat. Res.**, **303**: 55-61, 1993.
- FINLAYSON-PITTS, B.J. & PITTS, J.N.Jr. **Atmospheric Chemistry: Fundamentals and experimental techniques**, New York, John Wiley, 1986. 1098 p.
- FLESSEL, P.; WANG, Y.Y.; CHANG, K.; WESOLOWSKI, J.J.; GUIRGUIS, G.N.; KIM, I.; LEVAGGI, D.; SIU, W. Seasonal variations and trends in concentrations of filter-collected polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and mutagenic activity in the San Francisco Bay area. **J. Air Waste Manage Assoc.**, **41**: 276-81, 1991.
- GRIFFOL, M.; SOLANAS, A.M.; BAYONA, J.M. Characterization of genotoxic components in sediments by mass spectrometric techniques combined with *Salmonella*/microsome test. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, **19**: 175-84, 1990.
- GUNDEL, L.A.; DAISEY, J.M.; CARVALHO, L.R.F.; KADO, N.Y.; SCHUETZLE, D. Polar organic matter in airborne particles: chemical characterization and mutagenic activity. **Environ. Sci. Technol.**, **27**: 2112-9, 1993.

- HOFNUNG, M. & QUILLARDET, P. Recent developments in bacterial short-term tests for the detection of genotoxic agents. **Mutagenesis**, **1**: 319-30, 1986.
- HOLLSTEIN, M.J.; McCANN, J.; ANGELOSANDO, D.; NICHOLS, W.W. Short term tests for carcinogens and mutagens. **Mutat. Res.**, **65**: 133-226, 1979.
- HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. A review. **Mutat. Res.**, **277**: 91-138, 1992.
- HOUK, V.S. & WATERS, M.D. Genetic toxicology and risk assessment of complex environmental mixtures. In: FAN, A.M. & CHANG, L.W. eds. **Human Risk Assessment**, New York, Marcel Dekker, Inc., 1995, p.367-99.
- HUEPER, W.C.; KOTIN, P., TABOR, E.C.; PAYNE, W.W.; FALK, H.; SAWICKI, E. Carcinogenic bioassay on air pollutants. **Arch. Pathol.**, **74**: 89-116, 1962.
- HUGHES, T.J.; PELLIZARI, E.; LITTLE, L.; SPARACINO, C.; KOLBER, A. Ambient air pollutants: collection, chemical characterization and mutagenicity testing. **Mutat. Res.**, **76**: 51-83, 1980.
- IWADO, H.; NAITO, M.; HAYATSU, H. Mutagenicity and antimutagenicity of air-borne particulates. **Mut. Res.**, **246**: 93-102, 1991.
- KADO, N.Y.; LANGLEY, D.; EISENSDADT, E. A simple modification of the *Salmonella* liquid-incubation assay. **Mutat. Res.**, **121**: 25-32, 1983.
- KADO, N.Y.; GUIRGUIS, N.; GUIRGUIS, C.; FLESSEL, P.; CHAN, R.C.; CHANG, K.; WESOLOWSKI, J.J. Mutagenicity of fine (2.5 μm) airborne particles: diurnal variation in community air determined by a *Salmonella* micro preincubation (microsuspension) procedure. **Environ. Mutagen.**, **8**: 53-66, 1986.
- KADO, N.Y.; WONG, J.M.; KUZMICKY, P.A.; WOODROW, J.E.; HANSUN, N.; SEIBER, J.N.; HSIEH, D.P.H. Quantitative integration of the *Salmonella* microsuspension assay with supercritical fluid extraction of model airborne vapor-phase mutagens. **Mutat. Res.**, **271**: 253-60, 1992.
- KAPPAS, A. & ALVARES, A.P. How the liver metabolizes foreign substances. **Sci. Am.**, **232**: 22-31, 1975.

- KOTIN, P.; FALK, H.L.; MADER, P.; THOMAS, M. Aromatic hydrocarbons. I. Presence in the Los Angeles atmosphere and the carcinogenicity of atmospheric extracts. *Arch. Ind. Hyg. Ocup. Med.*, 9: 153-63, 1954.
- KRAMERS, P.G.N. Mutagenicity and cytotoxicity of aerosol extracts. In: COMMISSION OF EUROPEAN COMMUNITIES, ed. **Genetic effects of environmental chemicals**, 1987, p. 77-85.
- KREWSKI, D.; LOROUX, B.G.; CREASON, J. ; CLAXTON, L. Sources of variation in the mutagenic potency of complex chemical mixtures based on the *Salmonella*/microsome assay. *Mutat. Res.*, 276: 33-60, 1992.
- KRISHNA, G.; ONG, T.; WHONG, W.Z.; NATH, J. Mutagenicity studies of ambient airborne particles. I. Comparison of solvents systems. *Mutat. Res.*, 124: 113-20, 1983.
- KRISHNA, G.; NATH; J. SOLER, L. ONG, T. Comparative *in vivo* and *in vitro* genotoxicity studies of airborne particle extract in mice. *Mutat. Res.*, 171: 157-63, 1986.
- LEE, H.; LAW, S.M.; LIN, S.T. The effect of extraction solvent on the mutagenicity of airborne particles. *Toxicol. Let.*, 58: 59-67, 1991.
- LEE, H.; SU, S.Y.; LIU, K.S.; CHOU, M.C. Correlation between meteorological conditions and mutagenicity of airborne particulate samples in tropical monsoon climate area from Kaohsiung city, Taiwan. *Environ. Mol. Mutagen.*, 23: 200-07, 1994.
- LEWTAS, J. Genotoxicity of complex mixtures: strategies for the identification and comparative assessment of airborne mutagens and carcinogens from combustion sources. *Fund. Appl. Toxicol.*, 10: 571-89, 1988.
- LEWTAS, J.; GOTO, S.; WILLIAMS, K.; CHUANG, J.C.; PETERSEN, B.A.; WILSON, N.K.: The mutagenicity of indoor air particles in a residential pilot field study: Application and evaluation of new methodologies. *Atmospheric Environ.*, 21: 443-49, 1987.
- LEWTAS, J.; CHUANG, J.; NISHIOKA, M.; PETERSEN, B. Bioassay-directed fractionation of the organic extract of SRM 1649 urban air particulate matter. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 39: 245-56, 1990.

- LEWTAS, J.; DeMARINI, D.M.; FAVOR, J.; LAYTON, D.W.; MacGREGOR, J.T.; ASHBY, J.; LOHMAN, P.H.M.; HAYNES, R.H.; MENDELSON, M.L. Risk characterization strategies for genotoxic environmental agents. In: **Methods for genetic risk assessment**, Lewis Pub., CRC Press, 1993.
- LÖFROTH, G. **Chemical and biological characterization of urban particulate matter**. Solna, Sweden, Swedish Environmental Protection Agency, Report 3841, 1990. 68p.
- LOFTI, C.F.P.; BRENTANI, M.M.; BÖHM, G.M. Assessment of the mutagenic potential of ethanol auto engine gases by *Salmonella typhimurium* microsomal mutagenesis assay, using a direct exposure method. **Envir. Res.**, **52**: 225-30, 1990.
- LOUIS, J.B.; ALTERHOLT, T.B.; DAISEY, J.M.; McGEORGE, L.J.; McGARRITY, G.J. Mutagenicity of inhalable particulate matter at four sites in New Jersey. In: LIOY, P.J. & DAISEY, J.M. eds. **Toxic Air Pollution - A comprehensive study of non-criteria air pollutants**. New York, Lewis, 1987. p.125-65.
- MARON, D.M. & AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutat. Res.**, **113**: 173-215, 1983.
- MARTINS, M.H.R.B.; ALONSO, C.D.; ROMANO, J. Estudo da caracterização de aerossóis de Cubatão. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 17., Natal, Brasil, 1993.
- MAY, W.E.; BENNER Jr., B.A.; WIE, S.A.; SCHUETZLE, D.; LEWTAS, J. Standard reference materials for chemical and biological studies of complex environmental samples. **Mutat. Res.**, **276**: 11-22, 1992.
- McCOY, E.C.; ANDERS, M.; ROSENKRANZ, H.S. The basis of the insensitivity of *Salmonella typhimurium* strain TA98/ 1,8 DNP₆ to the mutagenic action of nitroarenes. **Mutat. Res.**, **121**: 17-23, 1983.

- McGEORGE, L.S.; LOUIS, J.B.; ATHERHOLD, T.B.; McGARRATY, G.J. Mutagenicity analysis of industrial effluents: Results and consideration for integration into water pollution control programs, *In: WATERS, M.D.; SANDHU, S.S.; LEWTAS, J.; CLAXTON, L.D.; STRAUSS, G.; NESNOWS.* eds. **Short term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures IV.** New York, Plenum Press, 1985. p. 247-67.
- MERSCH-SUNDERMAN, V.; KERN, S.; WINTERMAN, F. Genotoxicity of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons and related structures on *Escherichia coli* PQ37 (SOS Chromotest). **Environ. Mol. Mutagen.**, **18**: 41-50, 1991.
- MIGUEL, A.G.; DAISEY, J.M.; SOUSA, J.A. Comparative study of the mutagenic and genotoxic activity associated with inhalable particulate matter in Rio de Janeiro air. **Environ. Mol. Mutagen.**, **15**: 36-43, 1990.
- MILLER, J. Assay of β -galactosidase. *In: Experiments in Molecular Genetics*, New York, Cold Spring Laboratory, 1972, p. 352-5.
- MOLLER, M. & ALFHEIM, I. Mutagenicity and PAH-analysis of airborne particulate matter. **Atmosp. Env.**, **14**: 83-8, 1980.
- MOLLER, M.; ALFHEIM, L.; LARSSSEN, S.; MIKALSEN, A. Mutagenicity of airborne particles in relation to traffic and air pollution parameters. **Environ. Sci. Technol.**, **16**: 221-5, 1982.
- NIELSEN, P.A. Mutagenicity studies on complex environmental mixtures: selection of solvent system for extraction. **Mutat. Res.**, **276**: 117-23, 1992.
- NYLUND, L.; HAKALA, E. & SORSA, M. Application of a semi-automated SOS Chromotest for measuring genotoxicities of complex environmental mixtures containing polycyclic aromatic hydrocarbons. **Mutat. Res.**, **276**: 125-32, 1992.
- ORGENICS **The SOS Chromotest blue kit, version 4.1.**, Orgenics Ltd., Yavne, 1988, 19p.
- PITTS, J.N. Jr. On the trail of atmospheric mutagens and carcinogens: a combined chemical/microbiological approach. **Am. Zool.**, **25**: 415-31, 1985.

- PITTS, J.N. Jr.; GROSJEAN, D.; MISCHKE, T.M.; SIMMON, V.F.; POOLE, D. Mutagenic activity of airborne particulate organic pollutants. **Toxicol. Lett**, **1**: 65-70, 1977.
- PITTS, J.N. Jr.; Van CAUWENBERGHE, K.A.; GROSJEAN, D.; SCHMID, J.P.; FITZ, D.R.; BELSER, W.L.JR; KNUDSON, G.B.; HYND, P.M. Atmospheric reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons: Facile formation of mutagenic nitro derivatives. **Science**, **202**: 515-21, 1978..
- PITTS, J.N. Jr.; Van CAUWENBERGHE, K.A.; GROSJEAN, D.; SCHMID, J.P.; FITZ, D.R.; BELSER, W.L.JR; KNUDSON, G.B.; HYND, P.M. Chemical and microbiological studies of mutagenic pollutants in real and simulated atmospheres. In: WATERS, M.D.; NESNOW, S.; HUISINGH, J.L.; SANDHU, S.S.; CLAXTON, L. eds. **Application of Short-Term Bioassay in the fractionation of Complex Environmental Mixtures**. New York, Plenum Press, 1979. p. 353-79.
- PITTS, J.N. Jr.; HARGER, W.; LOKENSGARD, D.M.; FITZ, D.R.; SCORZIELL, G.M.; MEJIA, V. Diurnal variations in the mutagenicity of airborne particulate organic matter in California's south coast air basin. **Mutat Res**, **104**: 35-41, 1982.
- QUILLARDET, P.; HUISMAN, O.; D'ARI, R.; HOFNUNG, M. SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **79**: 5971-5, 1982.
- QUILLARDET, P. & HOFNUNG, M. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins - Procedures. **Mutat. Res.**, **147**: 65-78, 1985.
- ROSSMAN, T.G.; MEYER, LeR.W.; BUTLER, J.P.; DAISEY, J.M. Use of the microscreen assay for airborne particulate organic matter. In: WATERS, M.D.; SANDHU, S.S.; LEWTAS, J.; CLAXTON, L.; STRAUSS, G.C.; NESNOW, S. **Short term bioassays in the analysis of complex mixtures IV**, New York, Plenum Press, 1985, p.9-23.
- SANCHEZ P.S.; VALENT, G.U.; COELHO, M.C.L.S.; COIMBRÃO, C.A.; ALONSO, C.D.; SATO, M.I.Z. Mutagenic activity of airborne particulate extracts from São Paulo, Brazil. **Environ. Mol. Mutagen.**, **14** (Suppl 15): 170, 1990.

- SASAKI, Y.L.; ENDO, R.L.; IZUMIKAWA, S.; WATANABE, T.; ONOZUKA, H.; SUGA, K.; ISE, H.; ASAKUNO, K. Mutagenicity of airborne particulates. **Mutat. Res.**, **164**: 279, 1986.
- SATO, M.I.Z.; VALENT, G.U.; COELHO, M.C.L.S.; COIMBRÃO, C.A.; ALONSO, C.D.; SANCHEZ, P.S. Microbial assays in the screening of genotoxic air pollutants. **Environ. Mol. Mutagen.**, **17** (Suppl 19): 64-65, 1991.
- SCARPATO, R.; DEMARINO, F.; STRANO, A.; CURTI, A.; CAMPAGNA, R.; LOPRIENO, N.; BARBAI, I.; BARALE, R. Two years air mutagenesis monitoring in a northwestern rural area of Italy with an industrial plant. **Mutat. Res.**, **319**: 293-301, 1993.
- SCHEEPERS, P.T.J.; MARTENS, M.H.J.; VELDERS, D.D.; FIJNEMAN, P.; VAN KERKHOVEN, M.; NOORDHOEK, J. & BOS, R.P. 1-Nitropyrene as a Marker for the Mutagenicity of Diesel Exhaust-Derived Particulate Matter in Workplace Atmospheres. **Environ. Mol. Mutagen.** **25**: 134-47, 1995.
- SHIMADA, T.; & GUENGERICH, F.P. Inactivation of 1,3 - 1,6 and 1,8-dinitropyrene by cytochrome P450 enzymes in human and rat liver micromes. **Cancer Res.**, **50**: 2036-43, 1990.
- SIK, J.; CHAN, T.L.; GIBSON, T.L.; WOLFF, G.T. Contribution to bacterial mutagenicity from nitro-PAH compounds in ambient aerosols. **Atmos. Environ.**, **19**: 369-76, 1985.
- SIDEROPOULOS, A.S. & SPECHT, S.M. Mutagenic and antimutagenic effects of airborne particulate extracts in *Salmonella typhimurium* strains. **Environ. Mol. Mutagen.**, **23**: 62, 1994.
- SKOPEK, T.R.; LIBER, H.L.; KADEN, D.A.; THILLY, W.G. Relative sensitivities of forward and reverse mutation assays in *Salmonella typhimurium*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **75** (9): 4465-9, 1978a.
- SKOPEK, T.R.; LIBER, H.L.; KROLEWSKI, J.J.; THILLY, W.G. Quantitative forward mutation assay in *Salmonella typhimurium* using 8-azaguanine resistance as a genetic marker. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **75**: 410-4, 1978b.

- SZWARC, A. Mobile sources and air pollution in Brazil. In: **Annual Air Conference, 9**, Vail, Colorado, Conference Center, 1993.
- TAKEDA, N.; TERANISHI, K.; HAMADA, K. Mutagenicity of air pollutants collected at industrial, urban-residential and rural area. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, **32**: 688-92, 1984.
- TALCOTT, R. & HARGER, W. Airborne mutagens extracted from particles of respirable size. **Mutat. Res.**, **79**: 177-80, 1980.
- TALCOTT, R. & WEI, E. Airborne mutagens bioassayed in *Salmonella typhimurium*. **J. Natl. Cancer Inst.**, **58**: 449-51, 1977.
- TANNER, R.L.; MIGUEL, A.H.; de ANDRADE, J.B.; GAFFNEY, J.S.; STREIT, G.E. Atmospheric chemistry of aldehydes: Enhanced peroxyacetyl nitrate formation from ethanol fueled vehicular emissions. **Environ. Sci. Technol.**, **22**: 1026-34, 1988.
- TOKIWA, H.K.; MORITA, K.; TAKEYOSHI, H.; TAKAHASHI, K.; OHNISHI, Y. Detection of mutagenic activity in particulate air pollutants. **Mutat. Res.**, **48**: 237-48, 1977.
- TOKIWA, H.K.; KITAMORI, S.; HORIKAWA, K.; NAKAGAWA, R. Some findings on mutagenicity in airborne particulate pollutants. **Environ. Mutagen.**, **5**: 87-100, 1983.
- TUOMINEN, J.; SALAMAA, S.; PYYSALO, H.; SKITTÄ, E.; TIKKANEN, L.; NURMELA, T.; SORSA, M.; POHJOLA, V.; SAURI, M.; HIMBRG, K. Polynuclear aromatic compounds and genotoxicity in particulate and vapor phases of ambient air: effect of season, and meteorological conditions. **Environ. Sci. Technol.**, **22**: 1228-34, 1988.
- VALENT, G.U.; SATO, M.I.; COELHO, M.C.L.S.; COIMBRAO, C.A.; SANCHEZ, P.S. Monitoring Sao Paulo state rivers in Brazil for mutagenic activity using the Ames test. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, **8**: 371-81, 1993.
- VanHOUDT, J.J. Mutagenic activity of airborne particulate matter in indoor and outdoor environments. **Atmos. Environ.**, **24B**: 207-20, 1990.

- VARGAS, V.M.F.; MOTTA, V.E.P.; HENRIQUES, J.A.P. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. **Mutat. Res**, **319**: 31-45, 1993.
- VELLOSI, R.; VANNUCHI, C.; BIANCHI, F.; FIORIO, R.; ROSELLINI, D.; CIACCHINI, G.; GIACONI, V.; BRONZETTI, G. Mutagenic activity and chemical analysis of airborne particles collected in Pisa (Italy). **Bull. Environ. Toxicol.**, **52**: 465-73, 1994.
- VIAU, C.J.; SHERMAN, S.M.; SABHARWAL, P.S. Comparative extraction of genotoxic components of air particulates with several solvent systems. **Mutat. Res.**, **105**: 133-37, 1982.
- VIRAS, L.G.; ATHANASIOU, K.; SISKOS, P.A. Determination of mutagenic activity of airborne particulates and of the benzo(a) pyrene concentrations in Athens atmosphere. **Atmos. Environ.**, **24B**: 267-74, 1990.
- WATTS, R.R.; DRAGO, R.J.; MERRILL, R.G.; WILLIAMS, R.W.; PERRY, E.; LEWTAS, J. Wood smoke impacted air: mutagenicity and chemical analysis of ambient air in a residential area of Juneau, Alaska. **JAPCA**, **38**: 652-60, 1988.
- WRIGHT, A.S. The role of metabolism in chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis. **Mutat. Res.**, **75**: 215-241, 1980.

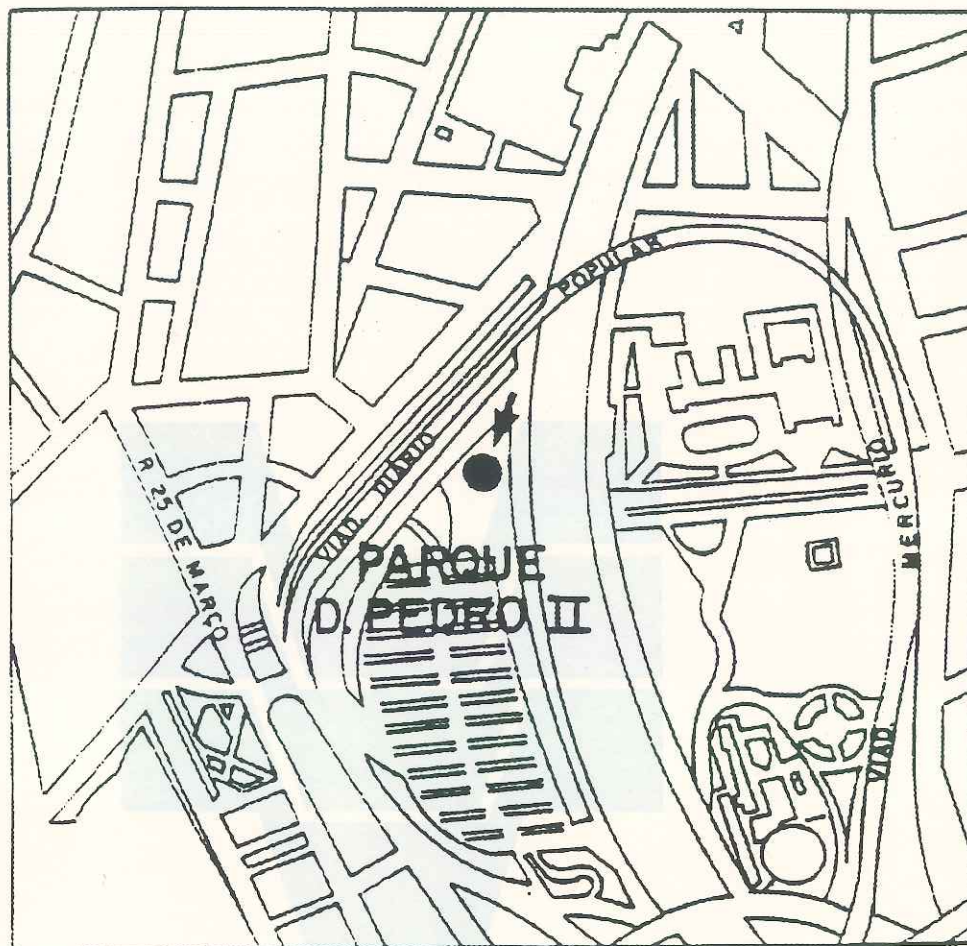
CETESB

3.12. AGRADECIMENTOS

- Ao Banco Internacional de Reconstrução e Desenvolvimento - BIRD (EUA) e ao Governo do Estado de São Paulo por possibilitarem a realização deste projeto e pelo suporte financeiro.
- À Coordenação do Programa de Controle de Poluição (PROCOP), em especial ao economista Luís Carlos da Costa e equipe, pelo apoio e assessoramento técnico-administrativo.
- Ao Dr. Larry D. Claxton do Health Environment Research Laboratory, Environmental Protection Agency, EUA, pelo treinamento fornecido e pela valiosa contribuição na discussão desse trabalho durante a consultoria.
- A Dra. Virginia Houk e Dr. David DeMarini do Health Environment Research Laboratory, Environmental Protection Agency, EUA,
- Ao Dr. Frederick De Serres do Center for Life Science and Toxicology, Research Triangle Institute, RTP, EUA e
- À Dra. Betty Olson da University of California, EUA,
Pelo suporte técnico-científico fornecido durante os treinamentos especializados realizados nas referidas instituições por membros da equipe técnica deste projeto.
- Ao Setor de Amostragem e Análise do Ar e ao Setor de Telemetria pela coleta das amostras, fornecimento de dados e auxílio na execução da parte técnica deste trabalho.
- Às equipes do Setor de Microbiologia e Parasitologia e Setor de Mutagênese e Citotoxicidade por sua colaboração inestimável na execução da parte técnica.
- À Bióloga Nancy de Castro Stoppe pelo valioso auxílio na elaboração deste relatório.
- À Judith B. Yamauti pelo excelente trabalho de datilografia.

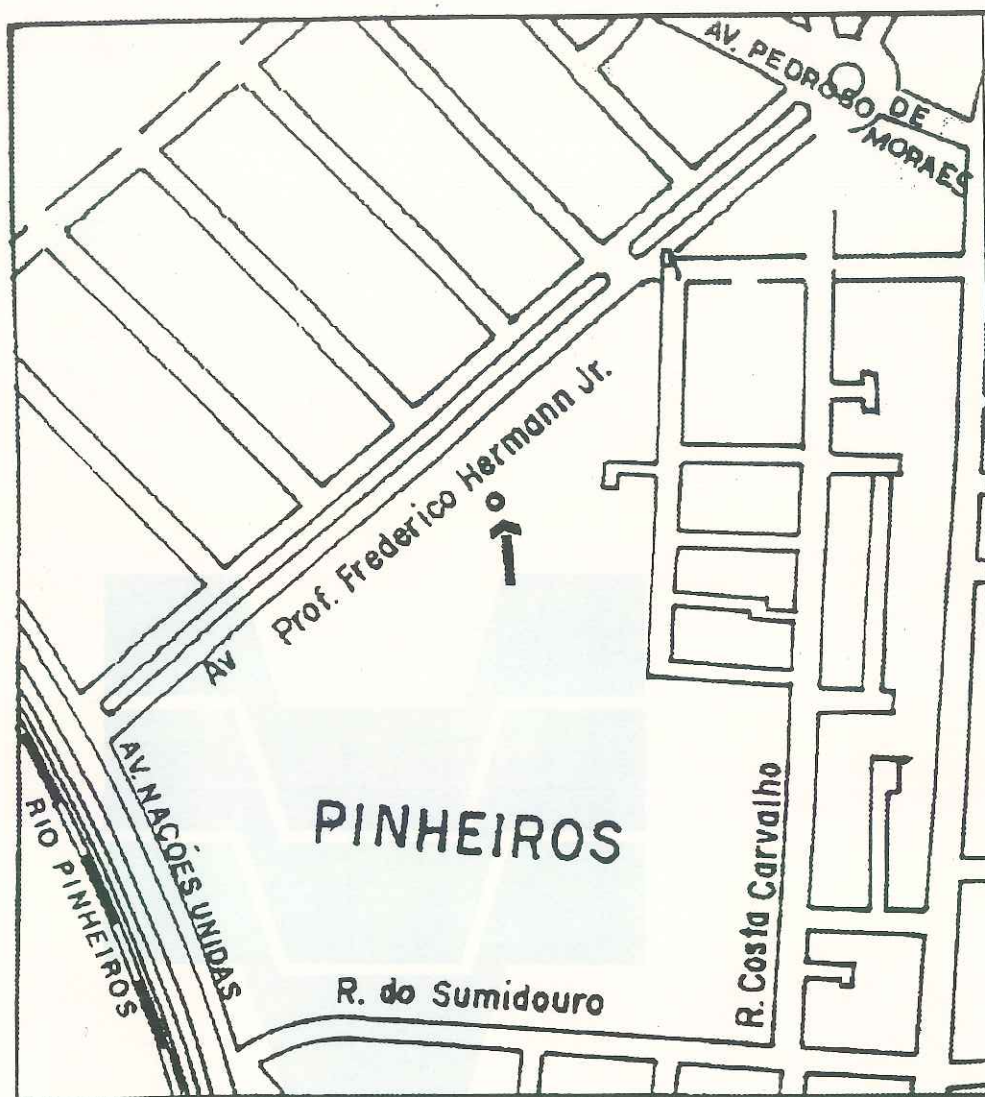
3.13. ANEXOS DO INFORME





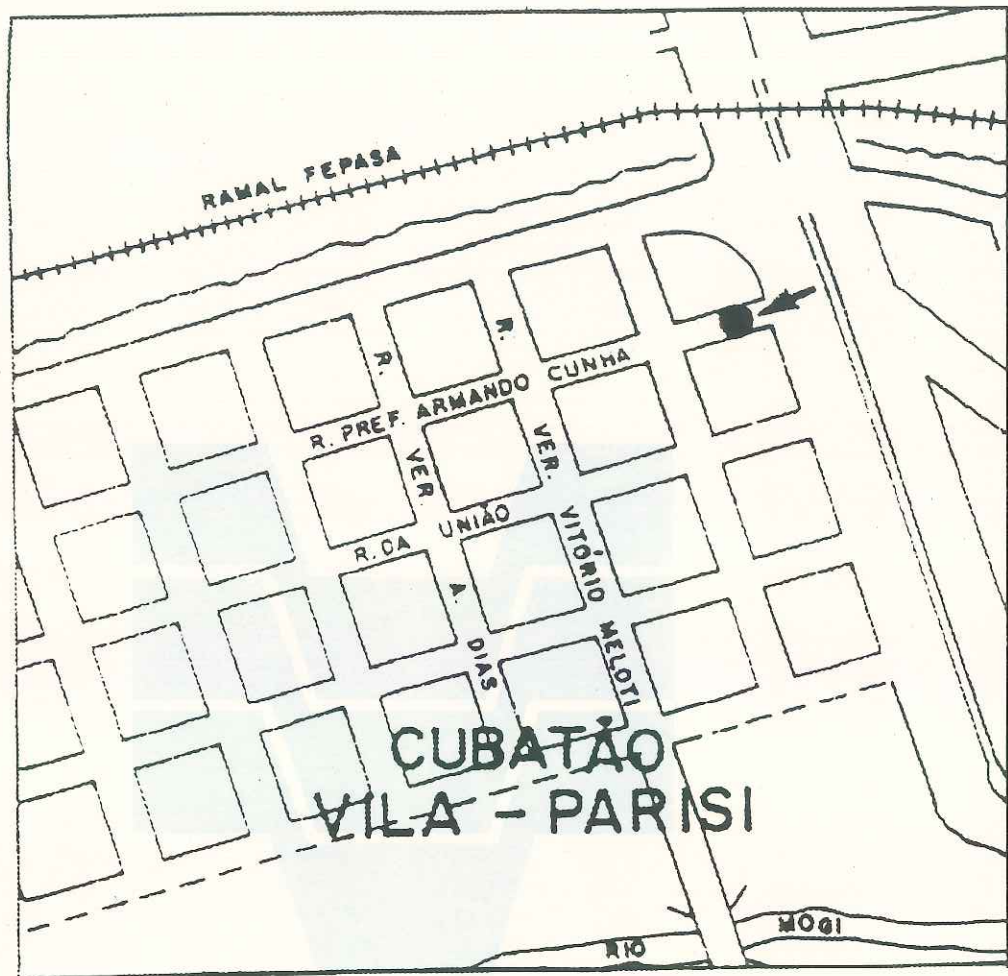
Latitude Sul: 23°32'43"
Longitude Oeste: 46°27'45"
Altitude: 730m

Figura 1 - Localização da estação de amostragem do Parque D. Pedro II (PDP), São Paulo, SP.



Latitude Sul: 23°33'40"
Longitude Oeste: 46°41'50"
Altitude: 720m

Figura 2 - Localização da estação de amostragem de Pinheiros (PIN), São Paulo, SP.



Latitude Sul: 23°50'32"
 Longitude Oeste: 46°22'57"
 Altitude: 10m

Figura 3 - Localização da estação de amostragem da Vila Parisi (CP), Cubatão, SP.

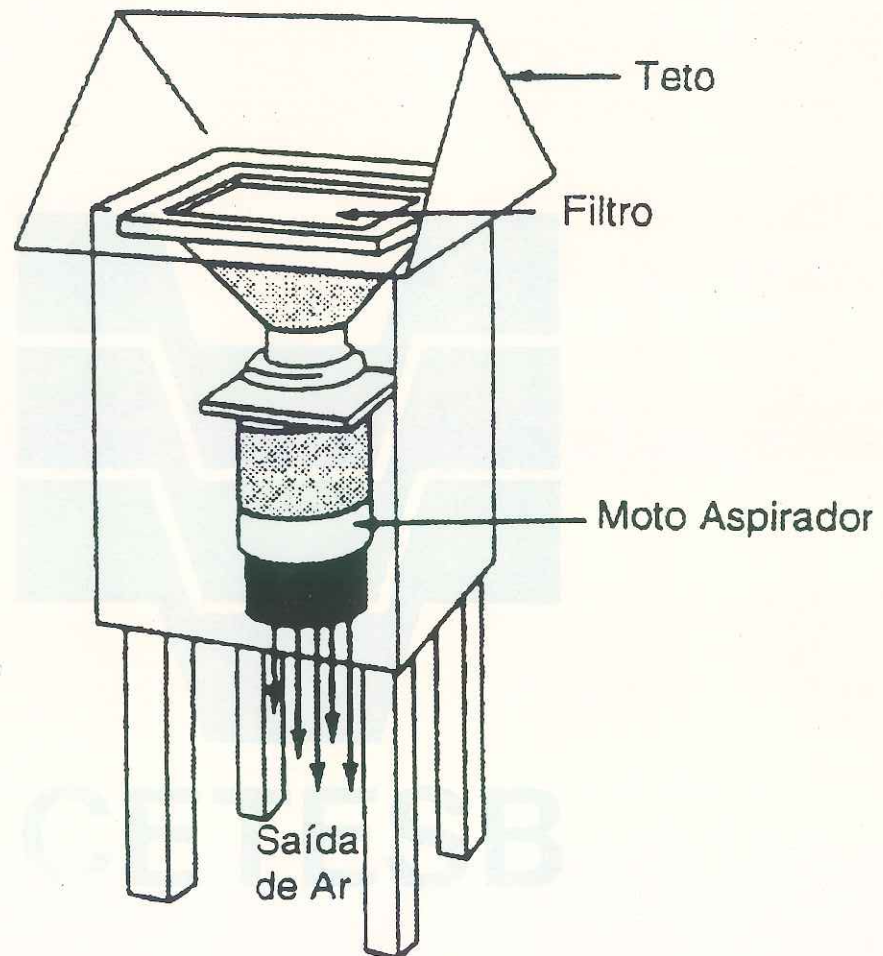


Figura 4 - Esquema do amostrador de ar HI-VOL.

Tabela 1 - Características genéticas das cepas de *Salmonella typhimurium*

LINHAGEM	MUTAÇÃO PARA HISTIDINA	TIPO DE MUTAÇÃO	ALVO DE MUTAÇÃO	TAXA DE REVERSÃO ESPONTÂNEA	OUTROS GENÓTIPOS
TA97a	<i>hisD6610</i>	"frameshift"	GC	90-180	<i>rfa</i> , Δ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ⁻ , pKM101
TA98	<i>hisD3052</i>	"frameshift"	GC	25-75	<i>rfa</i> , Δ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ⁻ , pKM101
TA98NR ¹					
TA98/1,8DNP ₆ ²					
TA100	<i>hisG46</i>	substituição pares de bases	GC	75 - 225	<i>rfa</i> , Δ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ⁻ , pKM101
TA104	<i>hisG428</i>	substituição pares de bases	AT	245 - 475	<i>rfa</i> , Δ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ⁻ , pKM101

1: nitroreductase deficiente

2: O-acetiltransferase deficiente

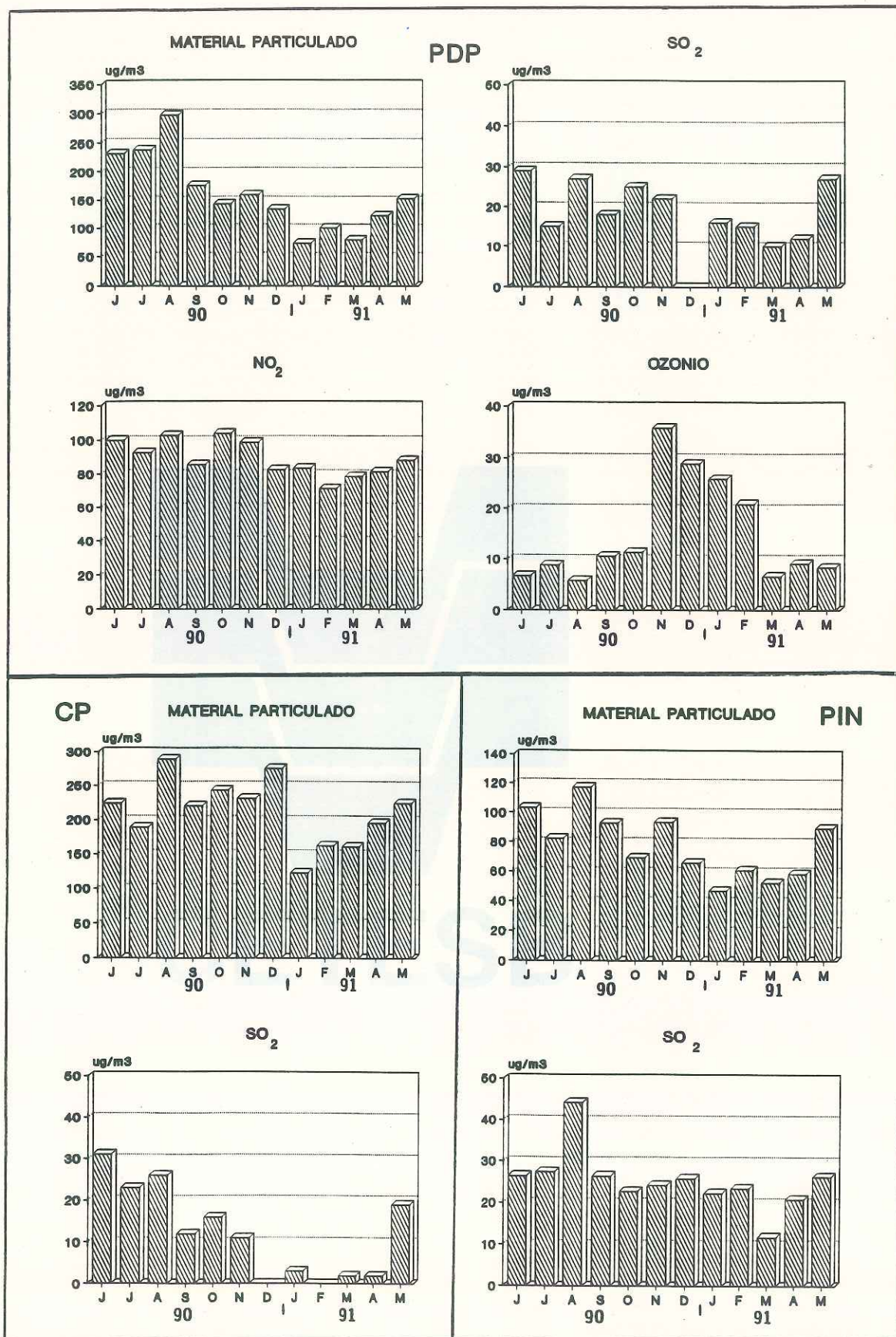


Figura 5 - Concentrações médias de poluentes atmosféricos em PDP, PIN e CP durante o período de junho de 1990 a maio de 1991.

Tabela 2 - Médias mensais de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação na cidade de São Paulo, durante o período de junho de 1990 a maio de 1991

MÊS (1990/1991)	TEMPERATURA (°C)	UMIDADE RELATIVA DO AR (%)	PRECIPITAÇÃO (mm)
Junho	16,4	73,6	39,2
Julho	14,7	81,9	121,0
Agosto	15,8	75,4	49,6
Setembro	16,7	72,4	96,1
Outubro	21,0	72,2	117,6
Novembro	22,8	74,1	76,0
Dezembro	21,8	75,1	124,7
Janeiro	22,0	78,9	270,7
Fevereiro	21,9	79,3	358,0
Março	21,1	84,6	451,3
Abril	20,3	79,8	178,4
Maiο	18,5	75,8	34,2

Tabela 3 - Médias mensais de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação na cidade de Cubatão, durante o período de junho de 1990 a maio de 1991

MÊS (1990/1991)	TEMPERATURA (°C)	UMIDADE RELATIVA DO AR (%)	PRECIPITAÇÃO (mm)
Junho	20,2	76,7	65,1
Julho	17,9	84,2	172,4
Agosto	18,4	82,9	111,3
Setembro	19,7	80,3	217,8
Outubro	22,6	83,0	182,0
Novembro	25,2	86,4	210,0
Dezembro	25,4	74,9	53,4
Janeiro	25,3	86,0	389,3
Fevereiro	25,7	90,8	262,2
Março	25,1	90,2	564,7
Abril	24,7	83,9	174,2
Maió	22,9	77,3	156,1

Tabela 4 - Concentrações de Partículas Totais em Suspensão (PTS) e Material Orgânico Extraído (MOE) nos pools das amostras de ar procedentes do Parque Dom Pedro (PDP), Pinheiros (PIN) e Cubatão (CP).

Amostra	Estação	N	Volume de ar amostrado (m ³)	PTS (µg/ m ³)	MOE (µg/ m ³)	MOE (%)
PDP	Inverno	14	1657	272,0	14,5	5,3
	Primavera	15	1639	160,3	12,0	7,5
	Verão	14	1639	104,9	9,7	9,3
	Outono	15	1620	118,5	8,7	7,3
PIN	Inverno	13	1638	92,7	6,4	5,3
	Primavera	14	1632	82,7	11,0	13,4
	Verão	14	1635	58,6	3,8	6,5
	Outono	15	1634	66,9	5,4	8,1
CP	Inverno	13	2108	221,4	4,2	1,9
	Primavera	13	2009	235,6	5,1	2,2
	Verão	13	1949	190,2	4,3	2,3
	Outono	15	1908	192,7	4,5	2,3

N: número de amostras analisadas

Tabela 5 - Concentrações de partículas totais em suspensão (PTS), material orgânico extraído (MOE) nas amostras de ar que apresentaram o maior valor mensal de partículas totais em suspensão (amostras H) procedentes do Parque Dom Pedro (PDP), Pinheiros (PIN) e Cubatão (CP).

MÊS	PDP			PIN			CP		
	PTS ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	MOE ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	MOE (%)	PTS ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	MOE ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	MOE (%)	PTS ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	MOE ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	MOE (%)
(1990/1991)									
Inverno									
Junho	370,7	33,7	9,1	171,0	25,1	14,7	384,0	12,1	3,2
Julho	289,0	29,1	7,5	129,0	8,8	6,8	269,0	6,7	1,7
Agosto	637,0	54,4	8,5	156,0	21,1	13,6	425,0	13,8	3,2
Primavera									
Setembro	408,0	30,8	7,5	202,0	18,2	9,0	342,0	8,0	2,5
Outubro	263,0	25,4	9,7	96,0	7,5	7,8	381,0	8,2	2,1
Novembro	211,0	12,8	6,1	120,0	9,7	8,1	353,0	8,8	2,5
Verão									
Dezembro	165,0	14,6	8,8	91,5	6,5	6,9	362,0	5,0	1,4
Janeiro	107,0	9,1	8,5	77,0	6,4	8,3	172,0	4,5	2,6
Fevereiro	125,0	11,0	8,8	74,0	13,2	17,8	224,0	4,5	2,0
Outono									
Março	122,0	10,5	8,6	84,0	5,7	6,8	224,0	5,5	2,5
Abril	174,0	15,0	8,6	86,0	9,9	11,5	274,0	7,4	2,7
Maiο	223,0	20,0	9,0	153,0	18,4	12,0	272,0	6,6	2,4

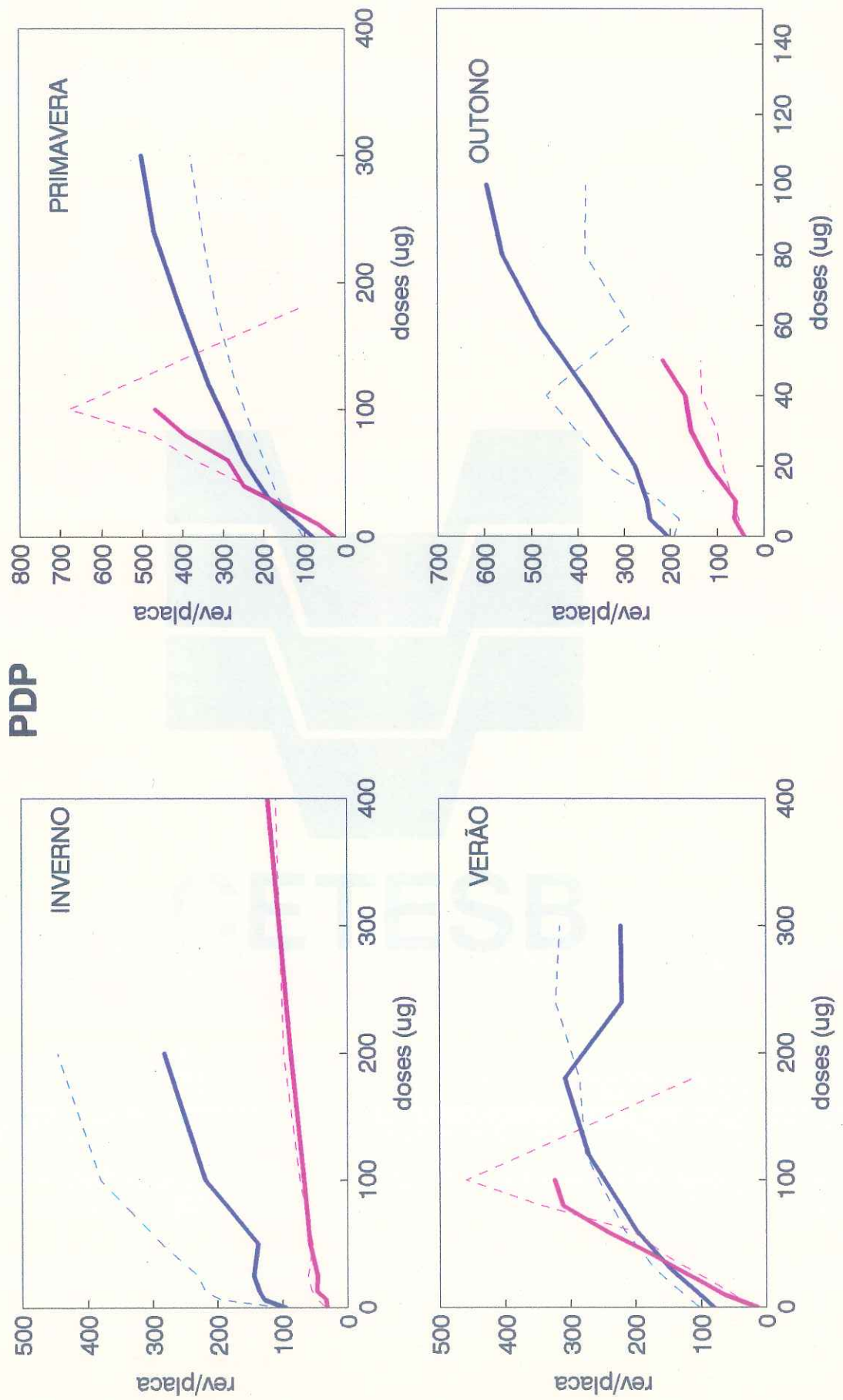


Figura 6 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos dos "pools" de material particulado de ar procedente do Parque D. Pedro (PDP) frente as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 (- - - - + S9; - - - - + S9) e TA100 (- - - - + S9; - - - - + S9).

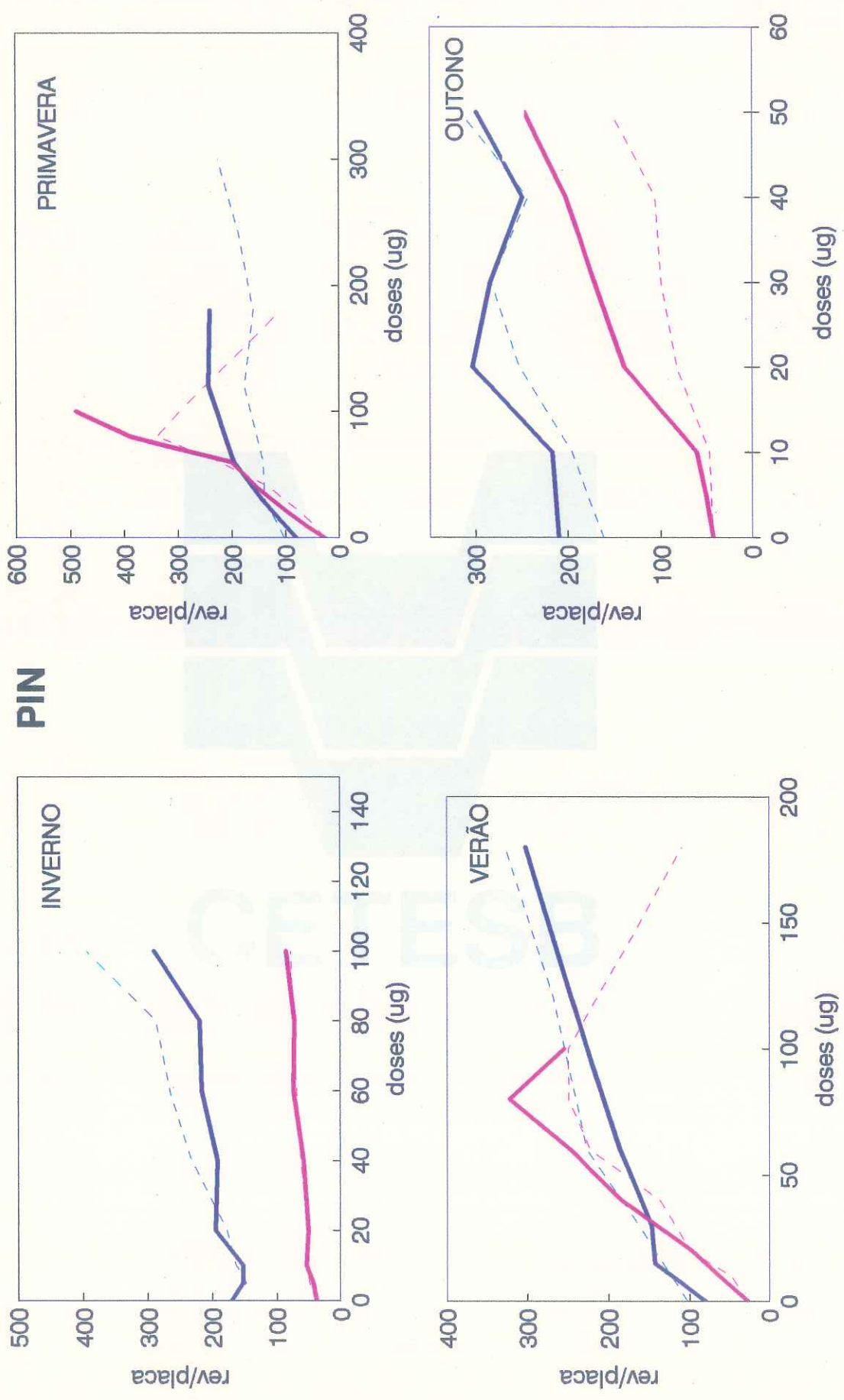


Figura 7 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos dos "pools" de material particulado de ar procedente de Pinheiros (PIN) frente as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA 98 (--- + S9; --- + S9; --- + S9) e TA100 (--- + S9; --- + S9).

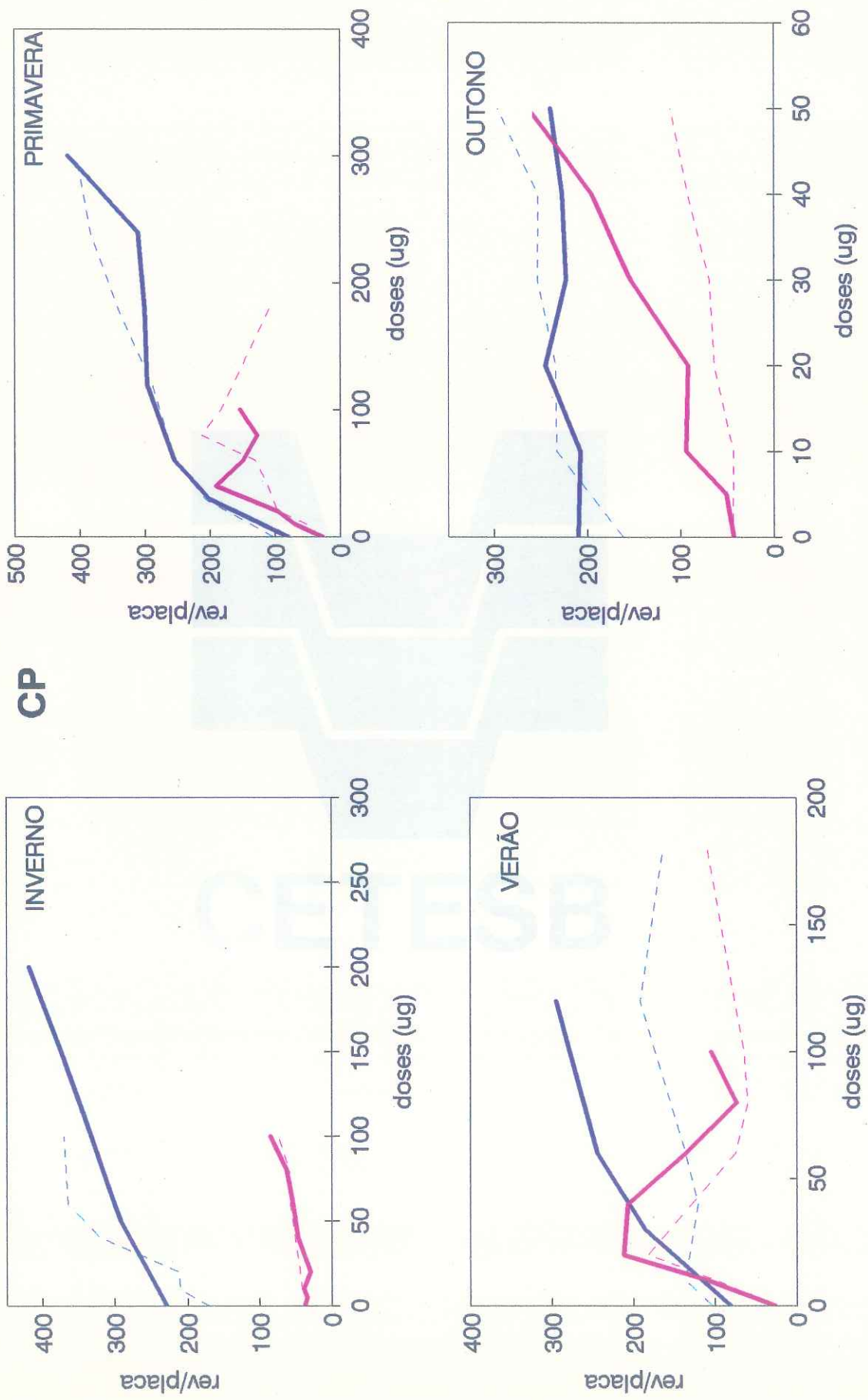


Figura 8 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos dos "pools" de material particulado de ar procedente de Cubatão (CP) frente as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA 98 (--- + S9; - - - - + S9) e TA100 (--- - S9; - - - - - S9).

Tabela 6 - Atividade mutagênica por massa de extrato orgânico (revertentes/ μg) e concentração mínima efetiva (CME) para as amostras de ar procedentes do Parque Dom Pedro (PDP), Pinheiros (PIN) e Cubatão (CP), obtida pelo Teste de Ames frente às cepas TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e ausência de ativação metabólica (S9).

Estação	Cepa	PDP		PIN		CP	
		Revert./ $\mu\text{g}\pm$ DP1	CME (μg)	Revert./ $\mu\text{g}\pm$ DP	CME (μg)	Revert./ $\mu\text{g}\pm$ DP	CME (μg)
INVERNO	TA98-S9	0,30 \pm 0,02	116,20	0,45 \pm 0,08	91,07	0,41 \pm 0,08	77,27
	TA98+S9	0,34 \pm 0,02	99,24	0,38 \pm 0,05	115,68	0,32 \pm 0,04	117,59
	TA100-S9	0,92 \pm 0,09	117,64	1,03 \pm 0,17	152,50	0,96 \pm 0,08	244,21
	TA100+S9	4,05 \pm 0,34	25,24	2,00 \pm 0,13	74,81	2,35 \pm 0,18	76,31
PRIMAVERA	TA98-S9	4,60 \pm 0,18	5,92	3,54 \pm 0,16	7,53	3,91 \pm 0,31	7,01
	TA98+S9	5,69 \pm 0,23	4,28	2,77 \pm 0,16	9,12	1,85 \pm 0,20	16,72
	TA100-S9	2,98 \pm 0,18	27,56	1,07 \pm 0,15	85,55	1,49 \pm 0,16	64,13
	TA100+S9	1,03 \pm 0,06	112,51	0,34 \pm 0,07	333,21	2,70 \pm 0,17	39,05
VERÃO	TA98-S9	3,60 \pm 0,13	4,08	3,05 \pm 0,22	9,70	5,65 \pm 0,56	5,28
	TA98+S9	3,67 \pm 0,21	5,05	2,65 \pm 0,19	10,53	7,43 \pm 0,67	3,71
	TA100-S9	1,71 \pm 0,07	49,08	1,29 \pm 0,20	72,62	2,91 \pm 0,15	28,26
	TA100+S9	1,17 \pm 0,09	95,83	2,05 \pm 0,14	51,20	0,63 \pm 0,10	170,68
OUTONO	TA98-S9	3,39 \pm 0,16	12,23	4,29 \pm 0,37	9,17	3,81 \pm 0,51	10,29
	TA98+S9	2,00 \pm 0,18	21,99	1,93 \pm 0,18	20,07	1,23 \pm 0,12	31,26
	TA100-S9	4,15 \pm 0,18	50,52	1,63 \pm 0,41	132,20	nd	-
	TA100+S9	7,21 \pm 0,76	23,61	2,82 \pm 0,45	59,55	2,45 \pm 0,34	71,13

itálico - indícios de mutagenicidade

1 - DP: desvio padrão

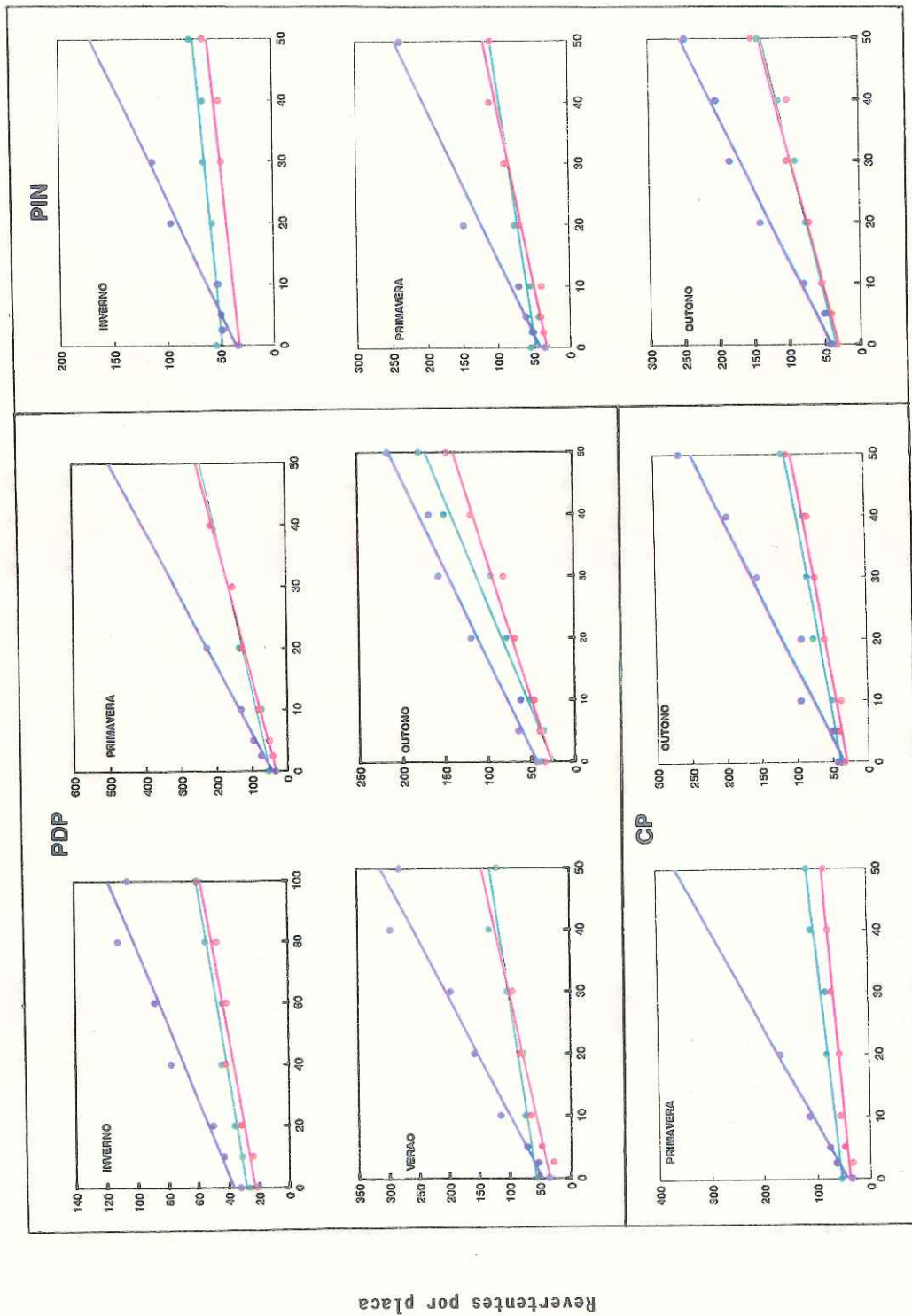
nd: não detectado

Tabela 8 - Resultados do teste de Ames para os pools PDP, PIN e CP com as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, TA98 NR e TA98/1,8DNP₆, expressos em revertentes/ μ g de MOE e porcentagem de redução da mutagenicidade devida a nitrocompostos, na ausência de ativação metabólica (S9).

Local	Estação	Revertentes/ μ g \pm DP ¹		
		TA98	TA98NR	TA98/1,8DNP ₆
PDP	Inverno	0,87 \pm 0,05	0,36 \pm 0,06 (59%)	0,33 \pm 0,06 (62%)
	Primavera	9,87 \pm 0,48	4,30 \pm 0,29 (57%)	2,60 \pm 0,63 (74%)
	Verão	5,66 \pm 0,35	2,37 \pm 0,21 (58%)	1,47 \pm 0,18 (74%)
	Outono	3,39 \pm 0,16	1,99 \pm 0,12 (41%)	2,55 \pm 0,22 (25%)
PIN	Inverno	2,64 \pm 0,25	0,55 \pm 0,11 (79%)	0,47 \pm 0,11 (82%)
	Primavera	4,30 \pm 0,29	1,68 \pm 0,15 (61%)	1,38 \pm 0,30 (68%)
	Verão	nt ²	nt	nt
	Outono	4,29 \pm 0,37	2,06 \pm 0,14 (52%)	1,95 \pm 0,25 (55%)
CP	Inverno	nt	nt	nt
	Primavera	7,05 \pm 0,51	1,01 \pm 0,12 (86%)	1,16 \pm 0,10 (84%)
	Verão	nt	nt	nt
	Outono	3,81 \pm 0,51	1,35 \pm 0,20 (65%)	1,45 \pm 0,13 (62%)

1 - DP: desvio padrão

2 - nt: não testado



Extrato Orgânico (ug/placa)

Figura 9 – Atividade mutagênica dos extratos orgânicos dos "pools" de material particulado procedentes da atmosfera de São Paulo (PDP e PIN) e Cubatão (CP) frente as linhagens TA98 (—), TA98NR (—) e TA98 1,8 DNP6 (—) de *Salmonella typhimurium*.

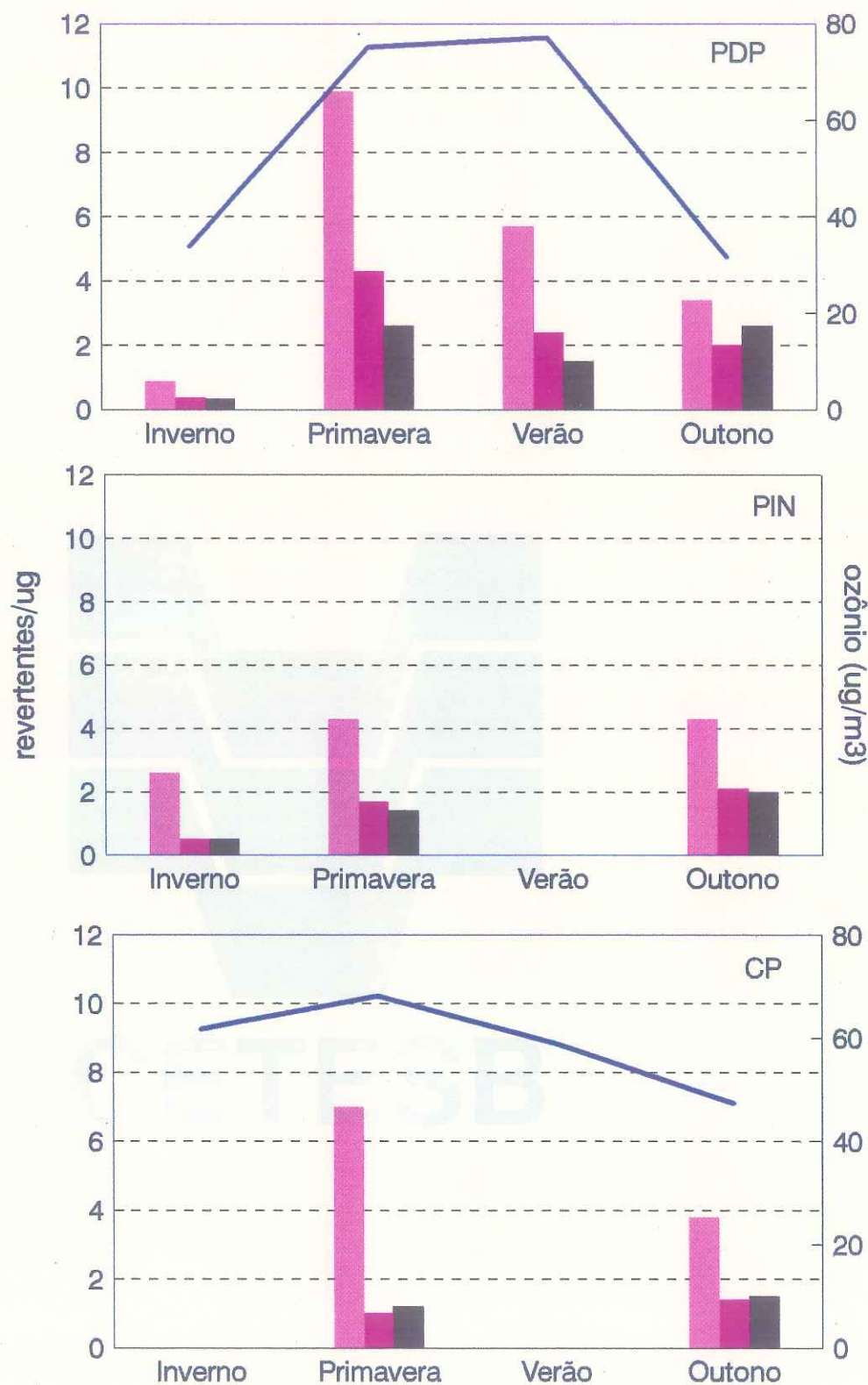


Figura 10 - Concentrações máximas de ozônio (—) e resposta mutagênica induzida nas linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 (■), TA98NR (■) e TA98/ 1,8 DNP6 (■) pelos extratos de "pools" de material particulado coletados em São Paulo (PDP, PIN) e Cubatão (CP), durante o período de junho de 1990 a maio de 1991.

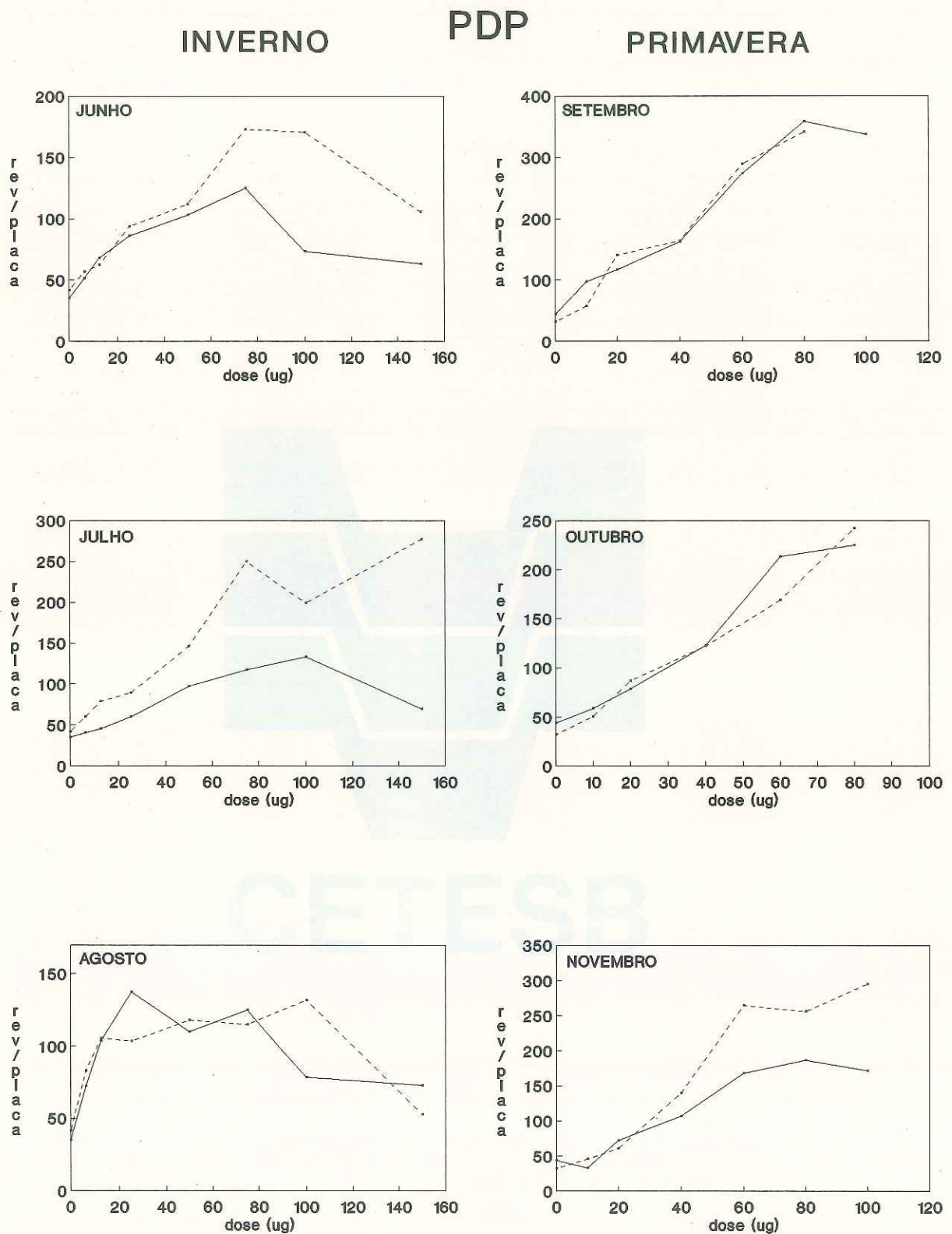


Figura 11 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos de material particulado de ar das amostras "H" procedentes do Parque D. Pedro (PDP) frente as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 na presença (-----) e ausência (—) de fração S9 durante o período de junho a novembro de 1990.

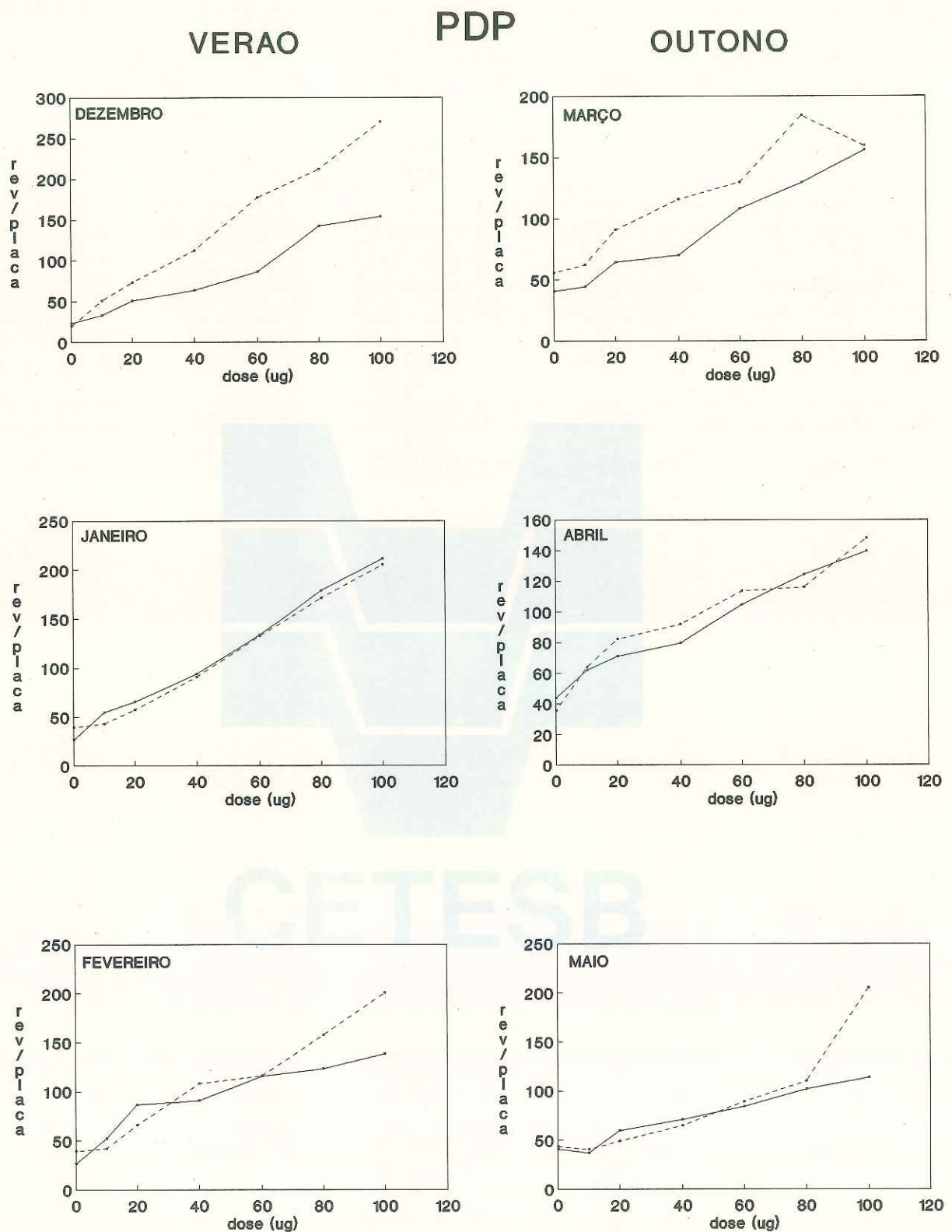


Figura 12 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos de material particulado de ar das amostras "H" procedentes do Parque D. Pedro (PDP) frente as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 na presença (-----) e ausência (—) de fração S9 durante o período de dezembro de 1990 a maio de 1991.

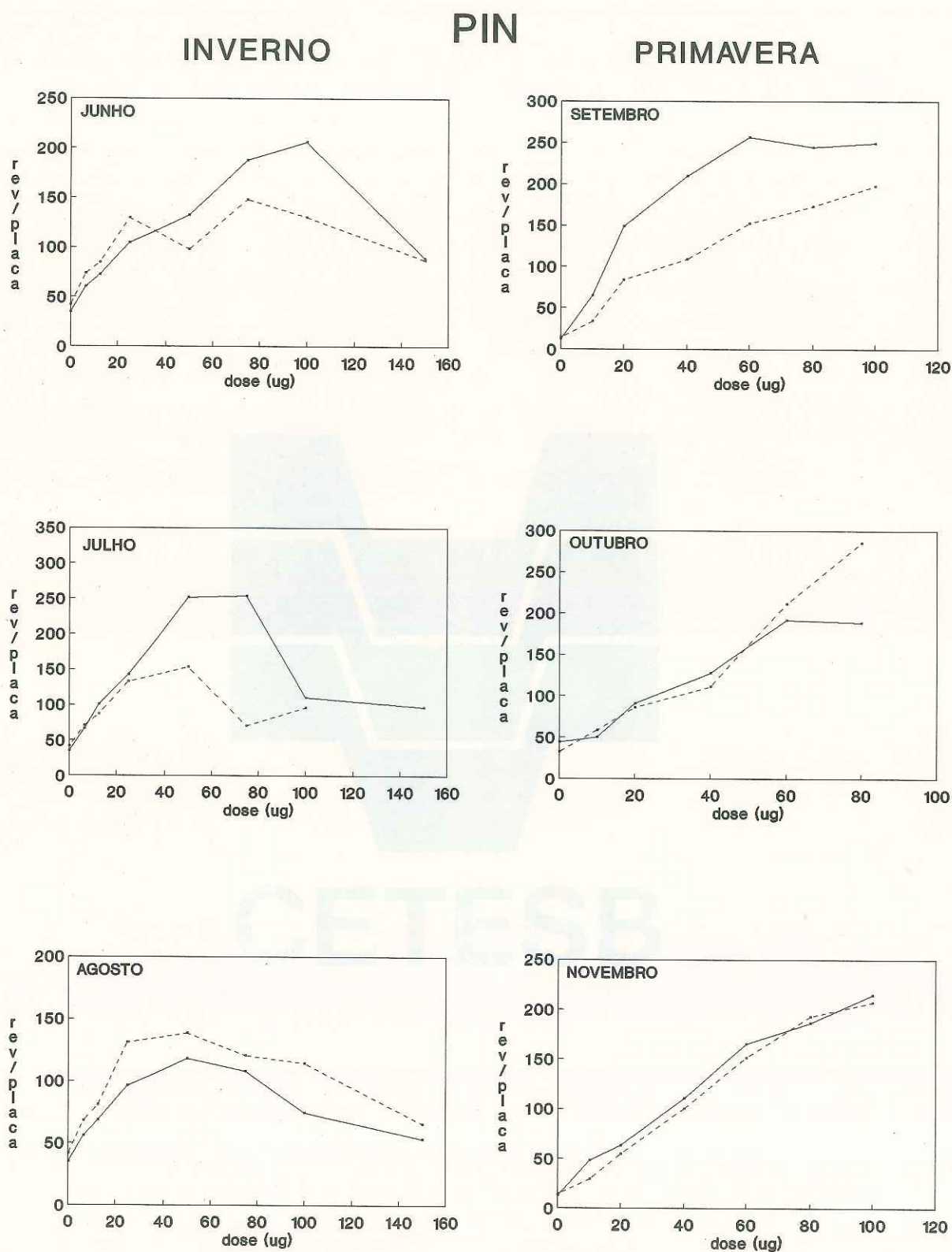


Figura 13 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos de material particulado de ar das amostras "H" procedentes de Pinheiros (PIN) frente as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 na presença (-----) e ausência (—) de fração S9 durante o período de junho a novembro de 1990.

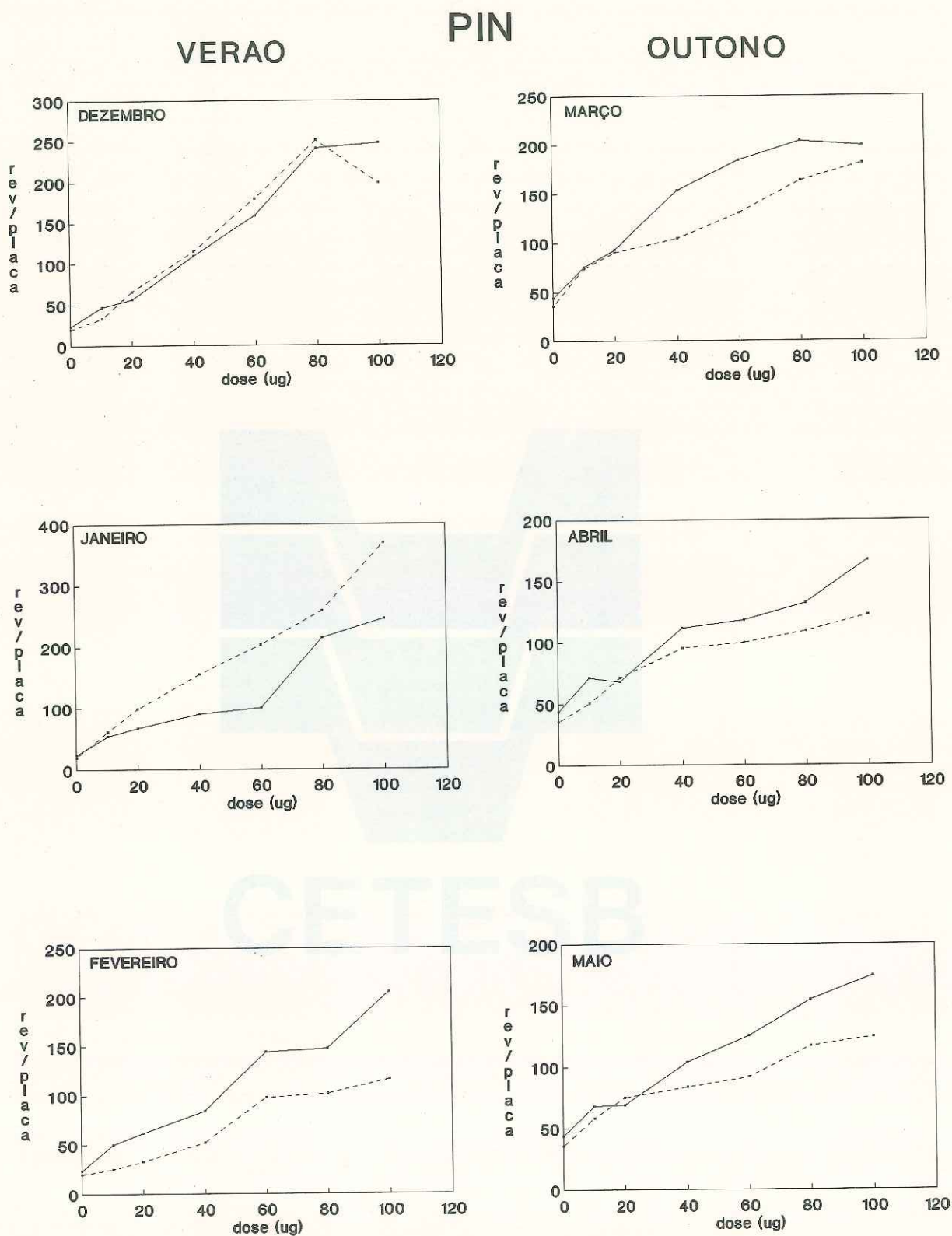


Figura 14 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos de material particulado de ar das amostras "H" procedentes de Pinheiros (PIN) frente as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 na presença (-----) e ausência (—) de fração S9 durante o período de dezembro de 1990 a maio de 1991.

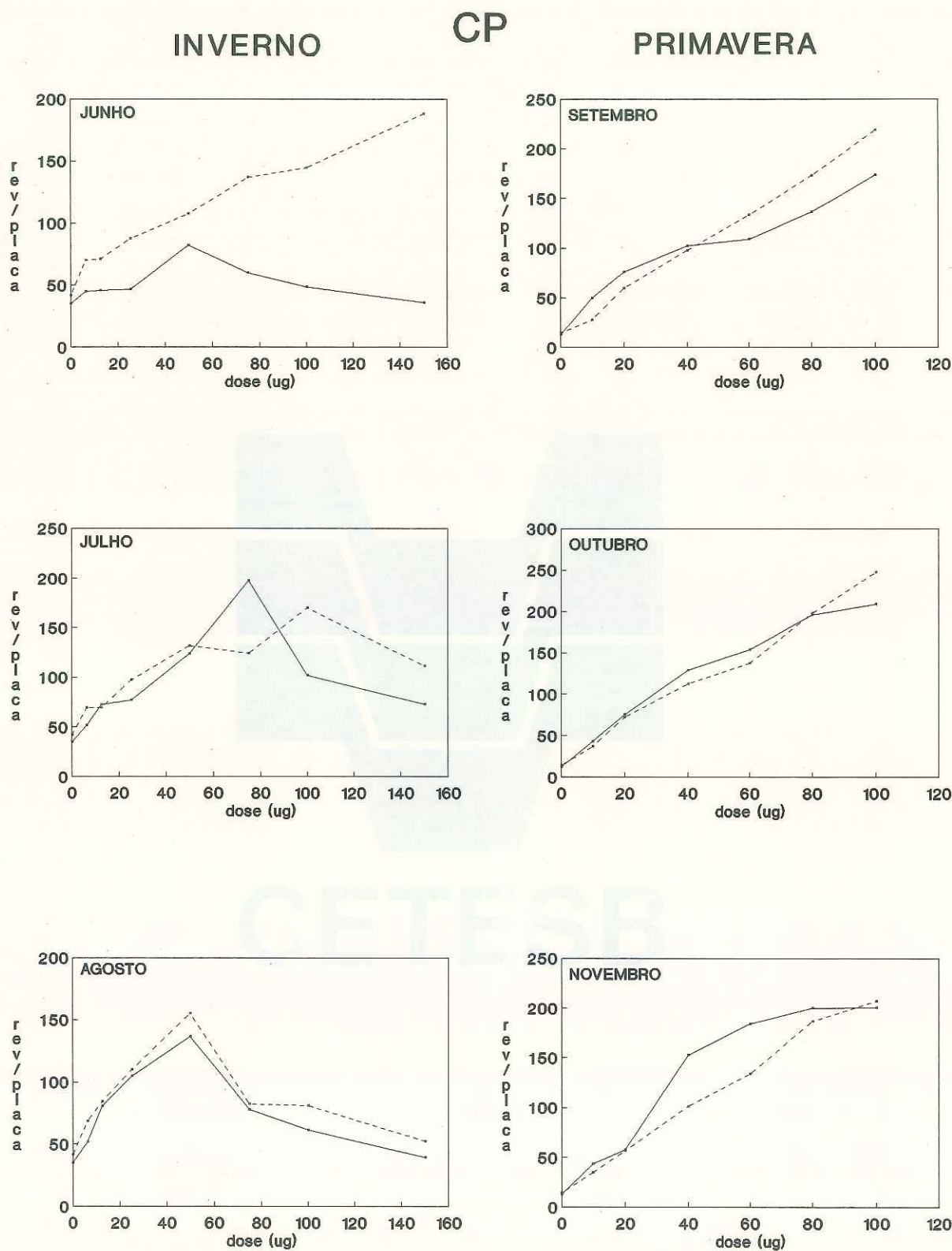


Figura 15 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos de material particulado de ar das amostras "H" procedentes de Cubatão (CP) frente as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 na presença (-----) e ausência (—) de fração S9 durante o período de junho a novembro de 1990.

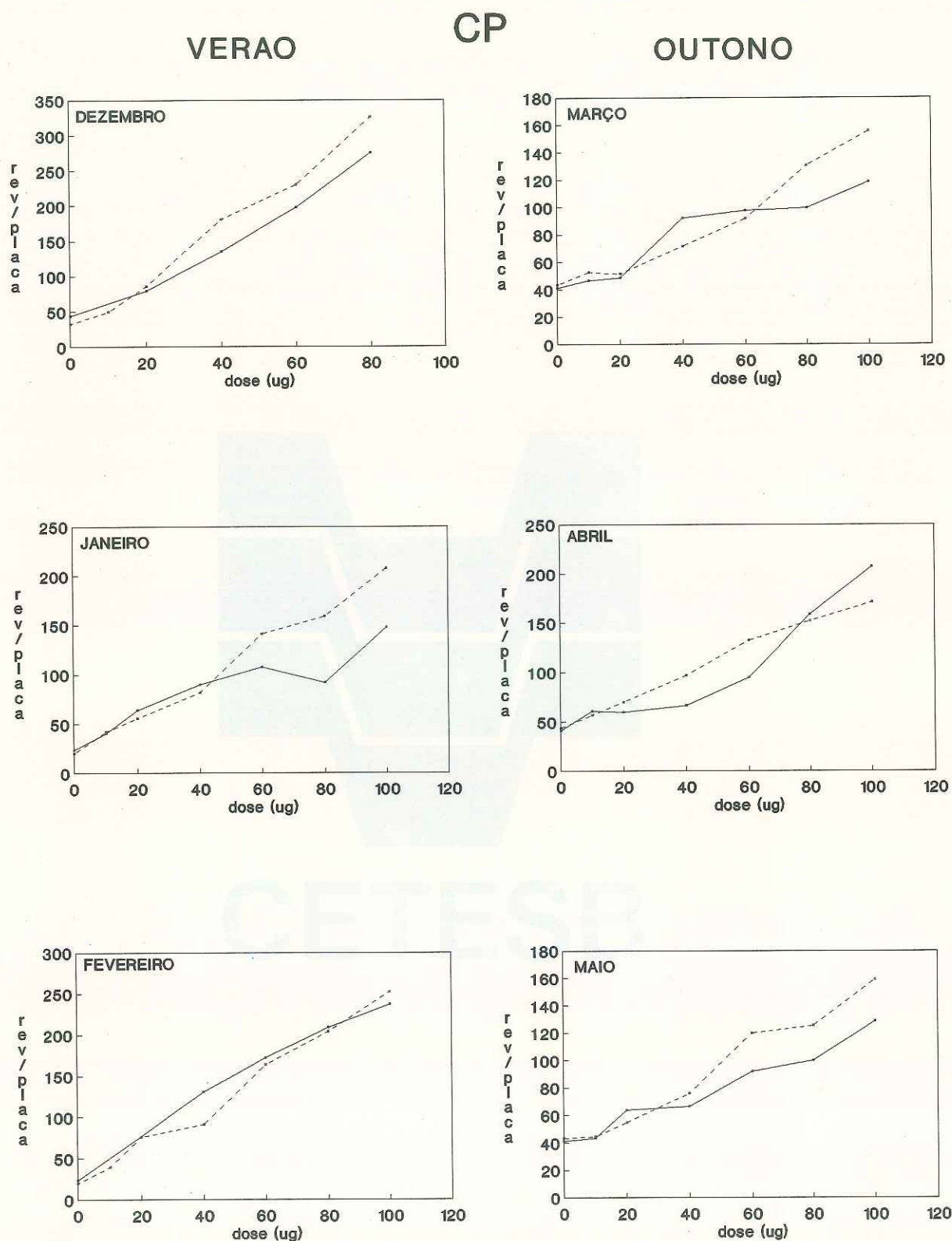


Figura 16 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos de material particulado de ar das amostras "H" procedentes de Cubatão (CP) frente as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 na presença (-----) e ausência (—) de fração S9 durante o período de dezembro de 1990 a maio de 1991.

Tabela 9 - Atividade mutagênica por massa de extrato orgânico (revertentes/ μg) para as amostras de ar que procedentes do Parque D. Pedro (PDP), Pinheiros (PIN) e Cubatão (CP), que apresentaram o maior valor mensal de partículas totais em suspensão, obtida pelo teste de Ames, frente à linhagem TA98 na presença e ausência de ativação metabólica.

Meses	revertentes / $\mu\text{g} \pm \text{DP}^1$					
	PDP		PIN		CP	
	TA98-S9	TA98+S9	TA98-S9	TA98+S9	TA98-S9	TA98+S9
1990/1991						
Junho	1,30 \pm 0,11	1,45 \pm 0,18	1,89 \pm 0,11	3,54 \pm 0,43	0,78 \pm 0,10	1,02 \pm 0,18
Julho	1,07 \pm 0,10	1,75 \pm 0,11	3,53 \pm 0,27	2,57 \pm 0,22	1,95 \pm 0,12	1,26 \pm 0,11
Agosto	4,53 \pm 0,42	1,73 \pm 0,30	1,20 \pm 0,14	1,33 \pm 0,20	2,28 \pm 0,18	2,42 \pm 0,30
Setembro	3,45 \pm 0,26	3,88 \pm 0,18	5,37 \pm 0,21	2,01 \pm 0,09	2,53 \pm 0,19	1,95 \pm 0,09
Outubro	2,31 \pm 0,12	2,42 \pm 0,10	2,08 \pm 0,14	2,72 \pm 0,18	2,27 \pm 0,11	2,25 \pm 0,05
Novembro	1,65 \pm 0,10	2,53 \pm 0,20	2,25 \pm 0,07	2,02 \pm 0,09	2,85 \pm 0,13	1,96 \pm 0,10
Dezembro	1,24 \pm 0,12	2,48 \pm 0,09	2,29 \pm 0,13	2,41 \pm 0,12	2,35 \pm 0,12	3,39 \pm 0,17
Janeiro	1,82 \pm 0,11	1,60 \pm 0,12	1,86 \pm 0,16	3,27 \pm 0,10	1,14 \pm 0,10	1,80 \pm 0,07
Fevereiro	1,63 \pm 0,13	1,53 \pm 0,10	1,71 \pm 0,08	1,01 \pm 0,05	2,33 \pm 0,06	2,24 \pm 0,10
Março	1,10 \pm 0,08	1,26 \pm 0,10	1,90 \pm 0,11	1,54 \pm 0,12	0,83 \pm 0,11	1,00 \pm 0,08
Abril	0,95 \pm 0,10	1,11 \pm 0,09	1,19 \pm 0,11	0,95 \pm 0,13	1,21 \pm 0,17	1,35 \pm 0,09
Maiο	0,78 \pm 0,06	0,80 \pm 0,08	1,34 \pm 0,11	0,93 \pm 0,11	0,82 \pm 0,10	1,13 \pm 0,07

1- DP: Desvio Padrão

Tabela 10 - Atividade mutagênica por volume de ar (revertentes/m³) para as amostras de ar procedentes do Parque D. Pedro (PDP), Pinheiros (PIN) e Cubatão (CP), que apresentaram o maior valor mensal de partículas totais em suspensão, obtida pelo teste de Ames, frente a linhagem TA98, na presença e ausência de ativação metabólica (S9).

Meses	revertentes / m ³ ± DP ¹					
	PDP		PIN		CP	
	TA98-S9	TA98+S9	TA98-S9	TA98+S9	TA98-S9	TA98+S9
1990/1991						
Junho	43,81±3,71	48,87±6,07	47,44±2,76	88,85±10,79	9,44±1,21	12,34±2,18
Julho	31,14±2,91	50,93±3,20	31,06±2,38	22,62±1,94	13,07±0,80	8,44±0,74
Agosto	246,43±22,85	94,11±16,32	25,32±2,95	28,06±4,22	31,46±2,48	33,40±4,14
Setembro	106,26±8,01	119,50±5,54	97,73±3,82	36,58±1,64	20,24±1,52	15,60±0,72
Outubro	58,67±3,05	61,47±2,54	15,60±1,05	20,40±1,35	18,61±0,90	18,45±0,66
Novembro	21,12±1,28	32,38±2,56	21,83±0,68	19,59±0,87	25,08±1,14	17,25±0,88
Dezembro	18,10±1,75	36,21±1,31	14,89±0,85	15,67±0,78	11,75±0,60	16,95±0,85
Janeiro	16,56±1,00	14,56±1,09	11,90±1,02	20,93±0,64	5,13±0,45	8,10±0,32
Fevereiro	17,93±1,43	16,83±1,10	22,57±1,06	13,33±0,66	10,49±0,27	10,08±0,45
Março	11,55±0,84	13,23±1,05	10,83±0,63	8,78±0,68	4,57±0,61	5,50±0,44
Abril	14,25±1,50	16,65±1,35	11,78±1,09	9,41±1,29	8,95±1,26	9,99±0,67
Maiο	15,60±1,20	16,00±1,60	24,66±2,02	17,11±2,02	5,41±0,66	7,46±0,46

1- DP: Desvio Padrão

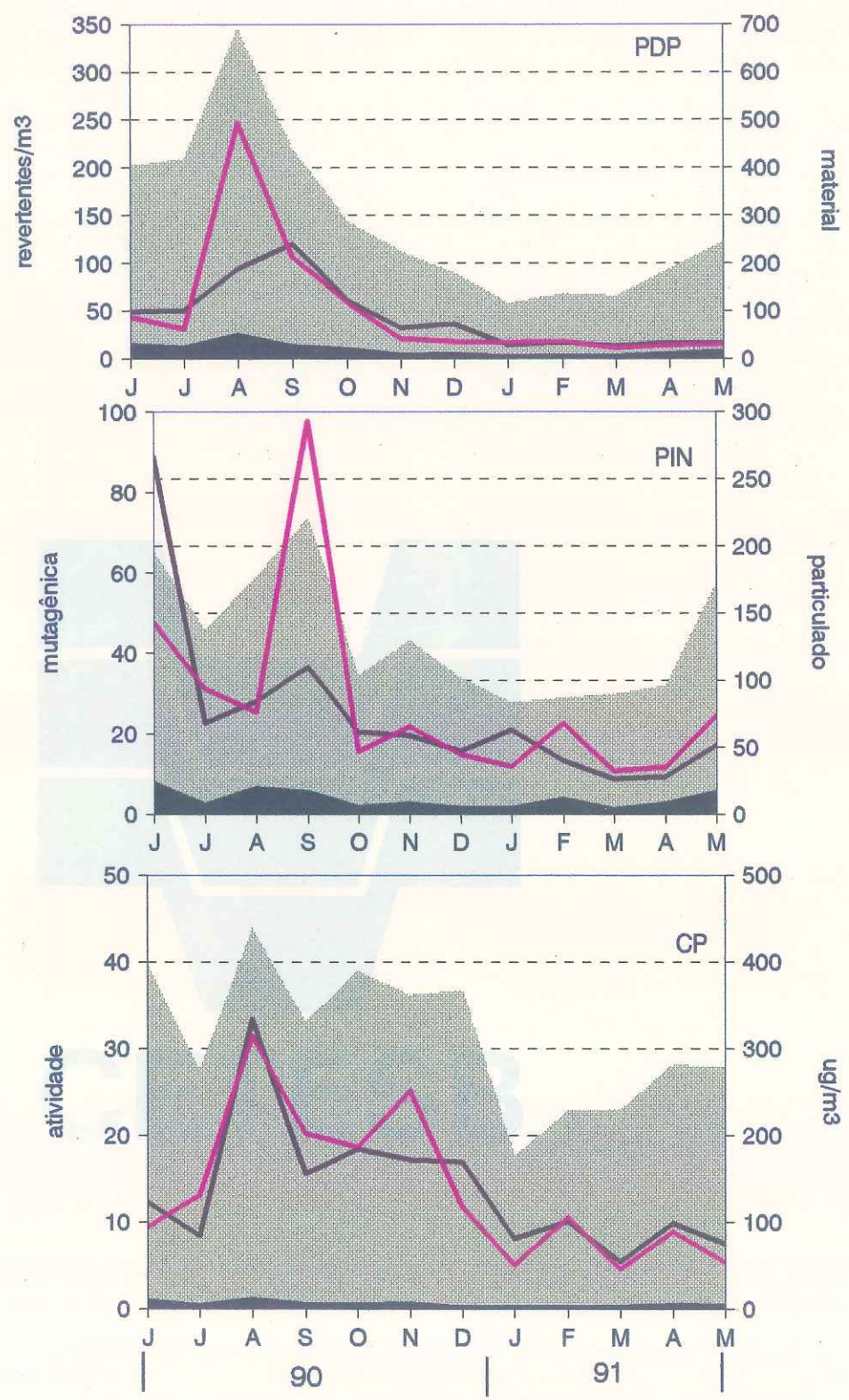


Figura 17 - Variação das concentrações de partículas totais em suspensão (■), material orgânico extraído (▨) e atividade mutagênica (*Salmonella typhimurium*: —TA98-S9 E —TA98+S9) nas amostras "H" procedentes de São Paulo (PDP, PIN) e Cubatão (CP), durante o período de junho de 1990 a maio de 1991.

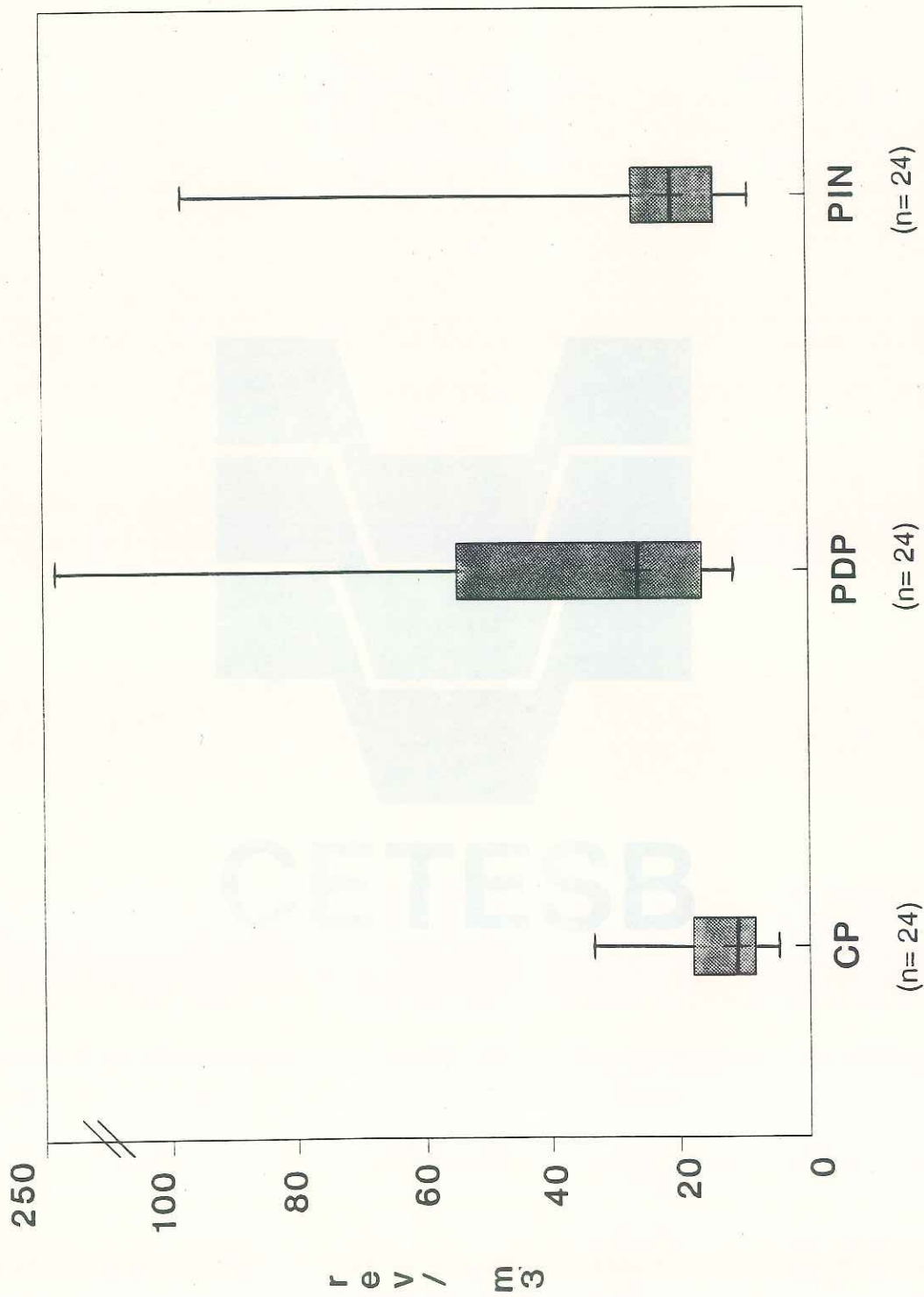


Figura 18 - Atividade mutagênica dos extratos orgânicos de material particulado de ar das amostras "H", procedentes de Cubatão (CP), Parque D. Pedro (PDP) e Pinheiros (PIN), expressa por volume de ar (revertentes/ m³) pelo método de box e whisker.

Tabela 11 - Correlação entre partículas totais em suspensão (PTS), material orgânico extraído (MOE) e resposta mutagênica (revertentes/m³) para as amostras "H" procedentes do Parque Dom Pedro (PDP), Pinheiros (PIN) e Cubatão (CP).

AMOSTRA	PTS x MOE	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r)			
		PTS x REV/m ³		MOE x REV/μg	
		-S9	+S9	-S9	+S9
PDP	0,98***	0,92***	0,83***	0,89***	0,78**
PIN	0,80**	0,84***	0,65*	0,61*	0,73**
CP	0,79**	0,75**	0,81**	0,68*	0,71**

* - P < 0,05

** - P < 0,01

*** - P < 0,001

CETESB

Tabela 12 - Atividade mutagênica por massa de extrato orgânico (revertentes/ μg) e concentração mínima efetiva (CME) para as amostras de ar procedentes do Parque D.Pedro (PDP), Pinheiros (PIN) e Cubatão (CP) obtida no teste de micro-suspensão (Teste de Kado) frente às cepas de *Salmonella typhimurium* TA98, TA97a, TA100 e TA104, na ausência e presença de S9.

Estação	Cepa	PDP		PIN		CP	
		Revert./ μg \pm DP ¹	CME (μg)	Revert./ μg \pm DP	CME (μg)	Revert./ μg \pm DP	CME (μg)
I	TA98 - S9	2,32 \pm 0,34	17,78	4,84 \pm 0,26	12,57	9,83 \pm 0,36	6,55
N	TA98 + S9	3,20 \pm 0,45	13,73	1,64 \pm 0,32	45,31	4,07 \pm 0,43	13,98
V	TA97a - S9	4,18 \pm 0,66	58,02	3,96 \pm 1,40	61,44	15,73 \pm 1,32	14,31
E	TA97a + S9	13,49 \pm 1,82	20,43	11,96 \pm 1,07	22,06	12,34 \pm 2,01	22,61
R	TA100 - S9	nd	-	2,52 \pm 0,53	65,22	nd	-
N	TA100 + S9	4,00 \pm 0,45	45,15	5,20 \pm 0,44	33,20	3,68 \pm 0,47	48,43
O	TA104 - S9	4,53 \pm 1,29	71,46	6,35 \pm 1,18	53,31	30,24 \pm 2,64	10,70
	TA104 + S9	5,40 \pm 0,48	63,81	9,84 \pm 0,83	37,40	23,31 \pm 1,25	15,69
P	TA98 - S9	32,44 \pm 2,17	0,79	17,58 \pm 1,70	1,31	29,65 \pm 3,24	0,97
R	TA98 + S9	11,66 \pm 1,13	1,95	1,44 \pm 0,45	17,42	6,40 \pm 0,70	3,80
I	TA97a - S9	57,10 \pm 3,39	2,18	52,03 \pm 2,69	2,24	55,49 \pm 2,03	2,11
M	TA97a + S9	33,02 \pm 1,14	4,04	22,50 \pm 0,68	5,40	33,50 \pm 1,40	4,30
A	TA100 - S9	10,64 \pm 0,78	10,20	7,87 \pm 0,95	12,49	30,08 \pm 1,98	3,24
V	TA100 + S9	7,92 \pm 0,64	15,27	2,92 \pm 0,59	34,84	11,72 \pm 0,99	10,74
E	TA104 - S9	12,30 \pm 0,71	14,79	10,71 \pm 1,44	15,03	35,93 \pm 2,32	5,41
R	TA104 + S9	40,17 \pm 6,05	5,25	10,30 \pm 0,84	18,74	14,68 \pm 0,79	13,43
A							
V	TA98 - S9	46,86 \pm 3,23	0,58	24,70 \pm 1,72	1,06	43,34 \pm 1,45	0,62
	TA98 + S9	11,72 \pm 0,74	1,76	4,56 \pm 0,61	4,88	8,53 \pm 0,40	2,60
E	TA97a - S9	79,83 \pm 3,98	1,49	nr		nr	
R	TA97a + S9	42,94 \pm 2,03	3,16	nr		nr	
Ã	TA100 - S9	9,80 \pm 0,59	10,83	nr		nr	
O	TA100 + S9	4,74 \pm 0,74	25,05	nr		nr	
	TA104 - S9	19,48 \pm 1,19	8,14	nr		nr	
	TA104 + S9	6,67 \pm 0,61	25,48	nr		nr	
O	TA98 - S9	30,63 \pm 1,07	1,73	42,23 \pm 2,55	1,05	54,41 \pm 3,51	1,13
	TA98 + S9	8,48 \pm 0,56	6,03	8,29 \pm 0,63	6,42	15,35 \pm 1,65	3,32
U	TA97a - S9	6,46 \pm 1,58	23,22	14,17 \pm 1,79	20,65	15,10 \pm 1,66	18,31
T	TA97a + S9	nc		2,03 \pm 1,02	187,40	11,87 \pm 1,21	29,84
O	TA100 - S9	7,51 \pm 0,57	43,41	12,31 \pm 1,13	25,63	14,66 \pm 0,80	23,56
N	TA100 + S9	6,60 \pm 0,96	61,47	6,40 \pm 0,72	61,90	nd	
O	TA104 - S9	42,10 \pm 2,68	12,83	18,70 \pm 1,15	28,36	68,51 \pm 6,86	7,32
	TA104 + S9	11,14 \pm 1,30	59,75	nd		nd	

itálico - indícios de mutagenicidade
nd - não detectado

nr - não realizado
nc - não calculável

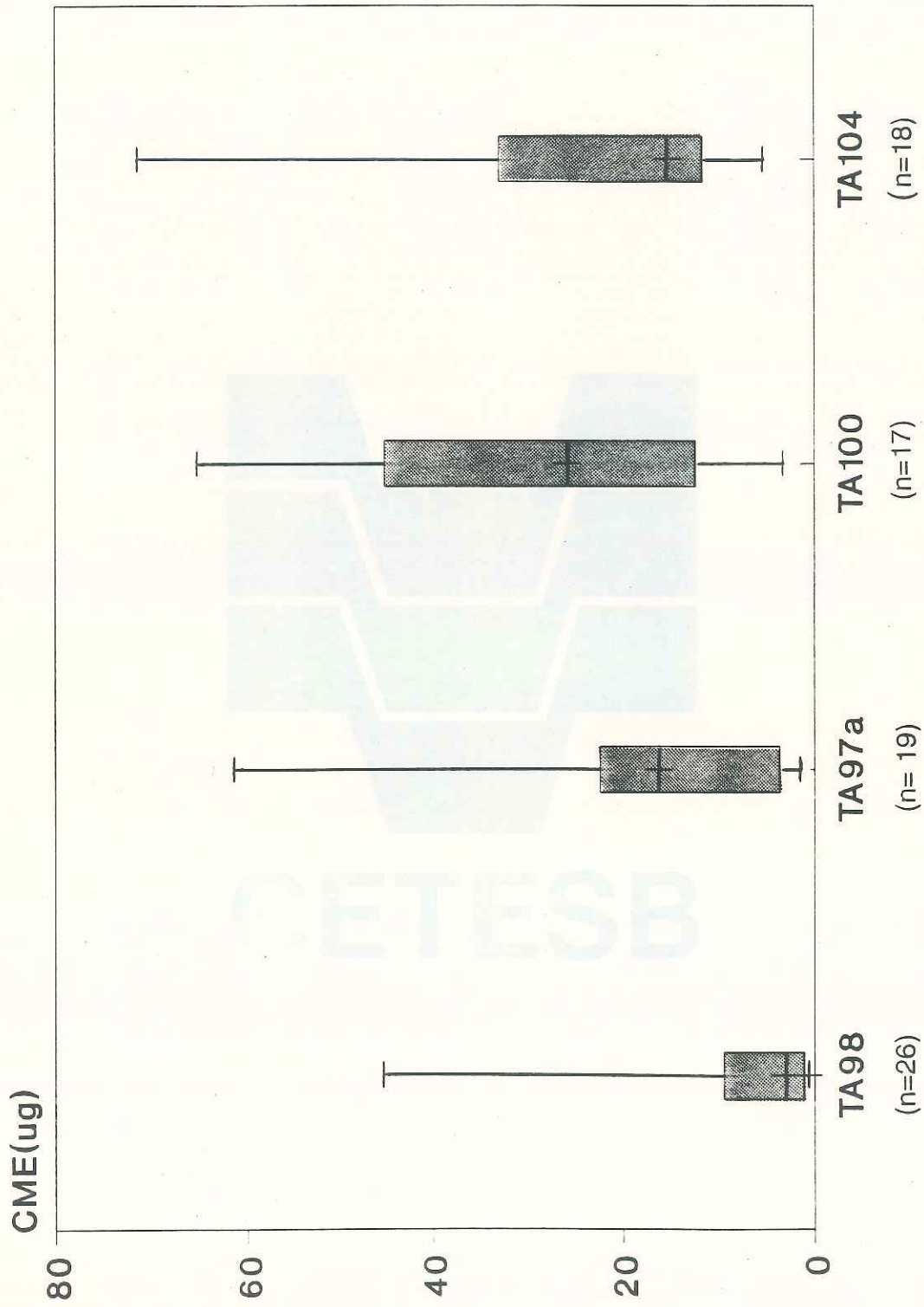


Figura 19 - Sensibilidade das diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium*, no teste de Kado, expressas em CME (μg) pelo gráfico de box e whisker, para os extratos orgânicos de material particulado de ar dos "pools" das amostras procedentes de São Paulo e Cubatão.

Tabela 13 - Atividade mutagênica por volume de ar (revertentes/m³) e concentração mínima efetiva (CME) para as amostras de ar procedentes do Parque D.Pedro (PDP), Pinheiros (PIN) e Cubatão (CP) obtida no Teste de Microssuspensão (Teste de Kado) frente às cepas de *Salmonella typhimurium* TA98, TA97a, TA100 e TA104, na ausência e presença de S9.

Estação	Cepa	PDP		PIN		CP	
		Revert./m ³ ± DP1	CME (m ³)	Revert./m ³ ± DP	CME (m ³)	Revert./m ³ ± DP	CME (m ³)
I	TA98 - S9	33,64±4,93	1,23	30,98±1,66	1,96	41,29±1,51	1,56
N	TA98 + S9	46,40±6,53	0,95	10,50±2,05	7,08	17,09±1,81	3,33
V	TA97a - S9	60,61±9,57	4,00	25,34±8,96	9,60	66,07±5,54	3,41
E	TA97a + S9	195,61±26,39	1,41	76,54±6,85	3,45	51,83±8,44	5,38
R	TA100 - S9	nd	-	16,13±3,39	10,19	nd	-
N	TA100 + S9	58,00±6,53	3,11	33,28±2,82	5,19	15,46±1,97	11,53
O	TA104 - S9	65,69±18,71	4,93	40,64±7,55	8,33	127,01±11,09	2,52
	TA104 + S9	78,30±6,96	4,40	62,98±5,31	5,84	97,90±5,25	3,74
P	TA98 - S9	389,28±26,04	0,07	193,38±18,70	0,12	151,22±16,52	0,19
R	TA98 + S9	139,92±13,56	0,16	15,84±4,95	1,58	32,64±3,57	0,74
I	TA97a - S9	685,20±40,68	0,18	572,33±29,59	0,20	283,00±10,35	0,41
M	TA97a + S9	396,24±13,68	0,34	247,50±7,48	0,49	170,85±7,14	0,84
A	TA100 - S9	127,68±9,36	0,85	86,57±10,45	1,14	153,41±10,10	0,64
V	TA100 + S9	95,04±7,68	1,27	32,12±6,49	3,17	59,77±5,05	2,11
E	TA104 - S9	147,60±8,52	1,23	117,81±15,84	1,37	183,24±11,83	1,06
R	TA104 + S9	482,04±72,60	0,44	113,30±9,24	1,70	74,87±4,03	2,63
A							
V	TA98 - S9	454,54±31,33	0,06	93,86±6,54	0,28	186,36±6,24	0,14
	TA98 + S9	113,68±7,18	0,18	17,33±2,32	1,29	36,68±1,72	0,60
E	TA97a - S9	774,35±38,61	0,15	nr		nr	
R	TA97a + S9	416,52±19,69	0,33	nr		nr	
Ã	TA100 - S9	95,06±5,72	1,12	nr		nr	
O	TA100 + S9	45,98±7,18	2,58	nr		nr	
	TA104 - S9	188,96±11,54	0,84	nr		nr	
	TA104 + S9	64,70±5,92	2,63	nr		nr	
O	TA98 - S9	266,48±9,31	0,20	228,04±13,77	0,19	244,85±15,80	0,25
	TA98 + S9	73,78±4,87	0,69	44,77±3,40	1,19	69,08±7,43	0,74
U	TA97a - S9	56,20±13,75	2,67	76,52±9,67	3,82	67,95±7,47	4,07
T	TA97a + S9	nc		10,96±5,51	34,70	53,42±5,45	6,63
O	TA100 - S9	65,34±4,96	4,99	66,47±6,10	4,75	65,97±3,60	5,24
N	TA100 + S9	57,42±8,35	7,07	34,56±3,89	11,46	nd	
O	TA104 - S9	366,27±23,32	1,48	100,98±6,21	5,25	308,30±30,87	1,63
	TA104 + S9	96,92±11,31	6,87	nd		nd	

itálico - indícios de mutagenicidade
nd - não detectado

nr - não realizado
nc - não calculável

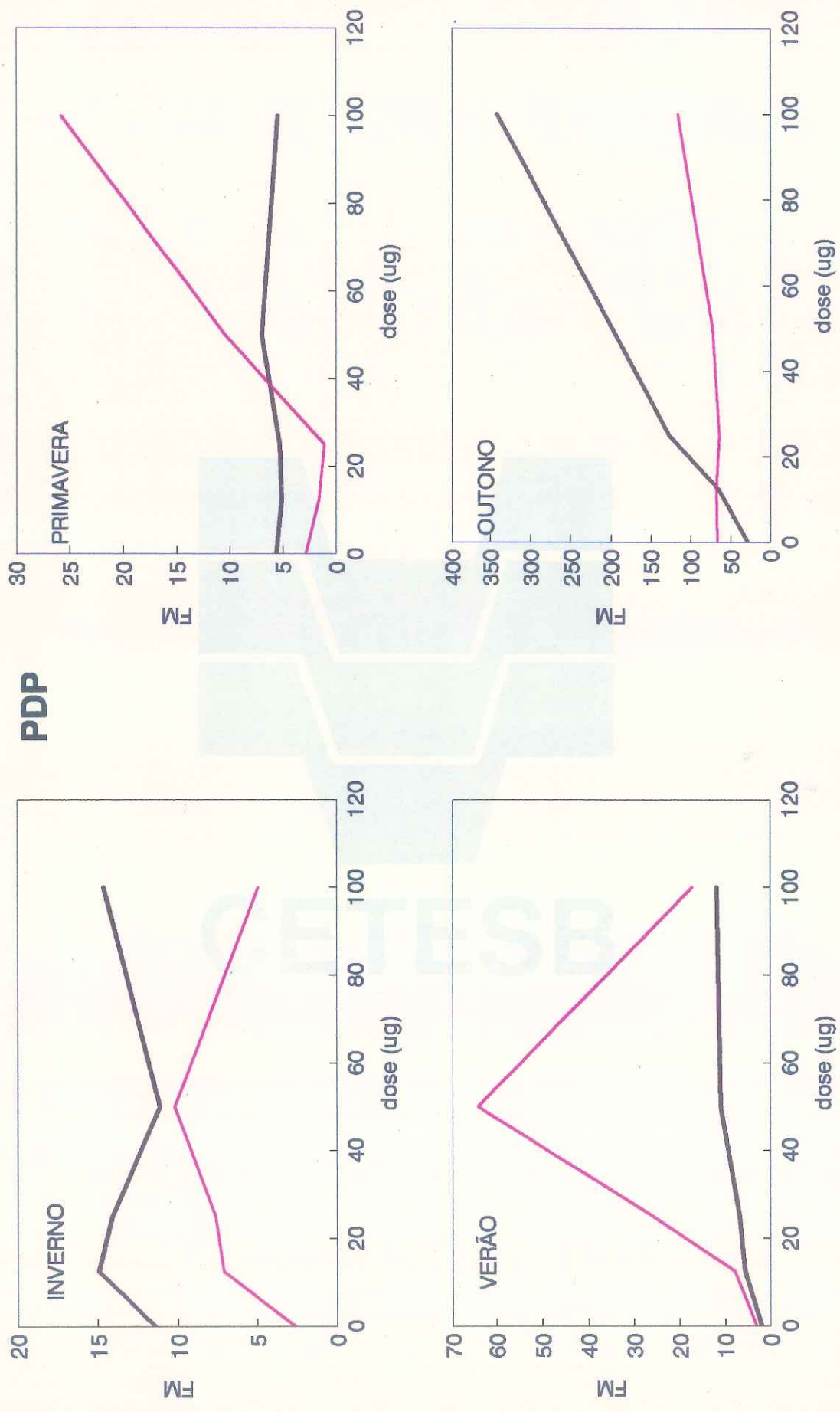


Figura 20 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos dos "pools" de material particulado de ar procedente do Parque D.Pedro (PDP), no ensaio de mutação direta frente a linhagem de *Salmonella typhimurium* TM677 na presença () e ausência () de ativação metabólica expressa em frequência de mutantes por 10^5 sobreviventes (FM/ 10^5).

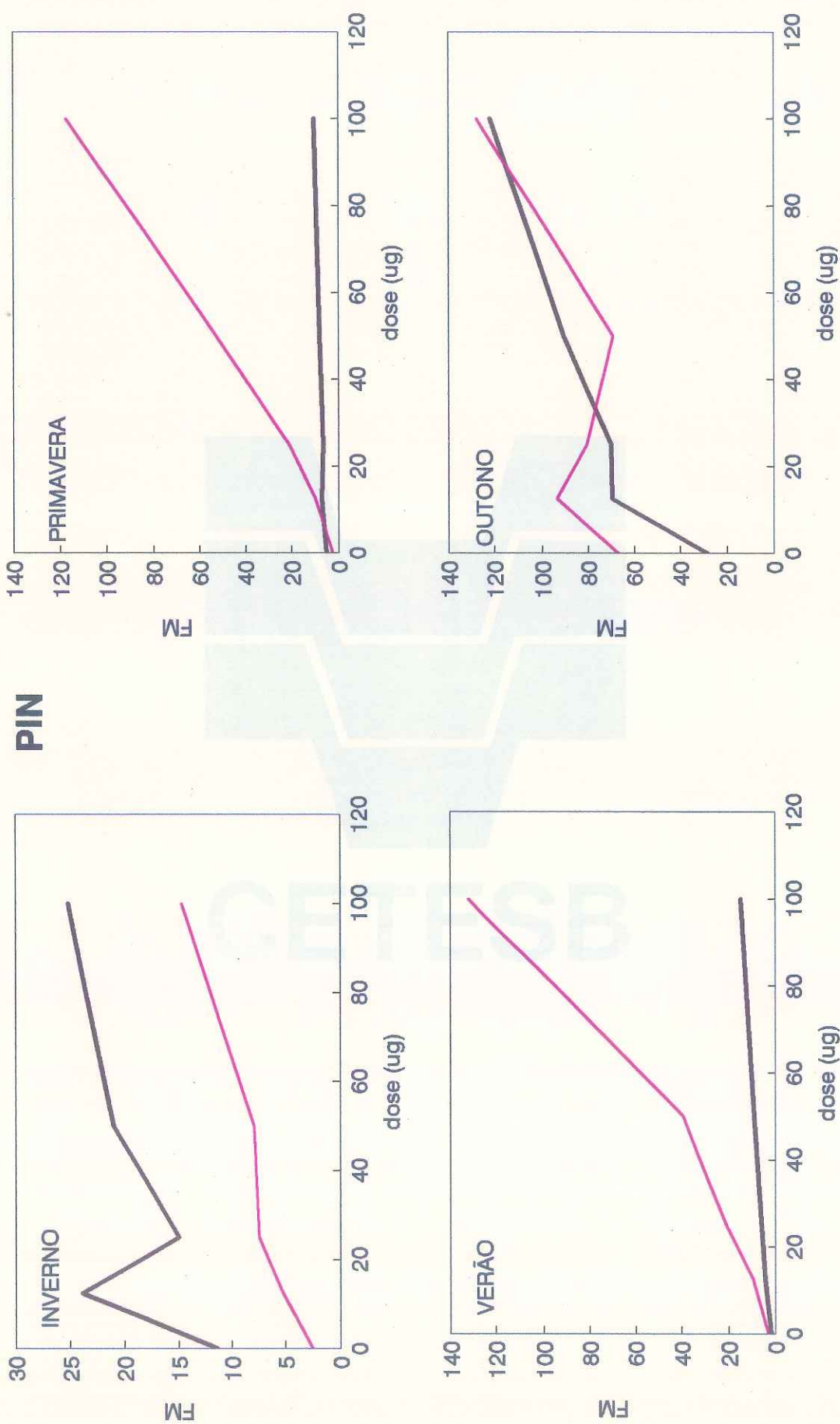


Figura 21 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos dos "pools" de material particulado de ar procedente de Pinheiros (PIN), no ensaio de mutação direta frente a linhagem de *Salmonella typhimurium* TM677 na presença (—) e ausência (—) de ativação metabólica expressa em frequência de mutantes por 10^5 sobreviventes (FM/ 10^5).

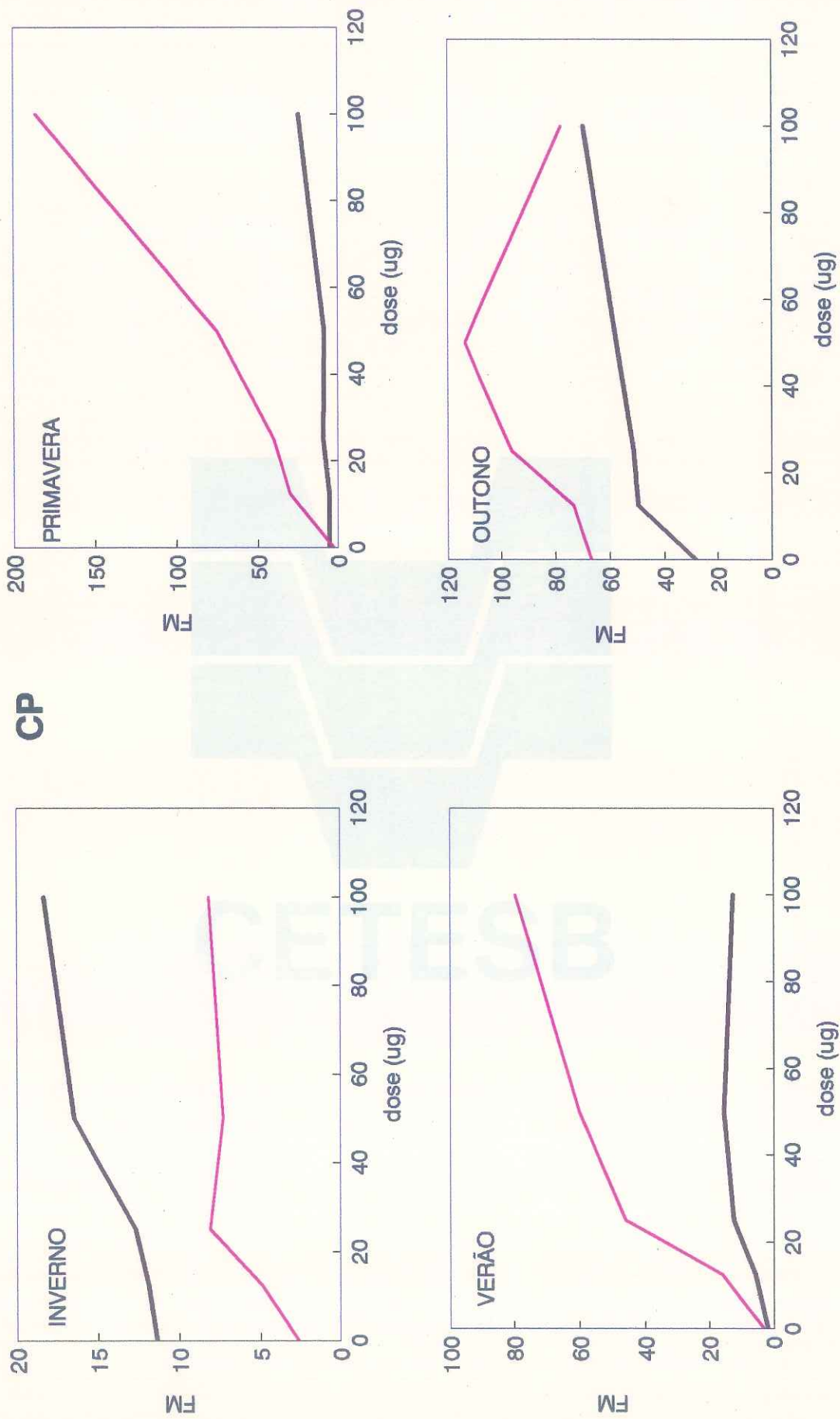


Figura 22 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos dos "pools" de material particulado de ar procedente de Cubatão (CP), no ensaio de mutação direta frente a linhagem de *Salmonella typhimurium* TM677 na presença (—) e ausência (—) de ativação metabólica expressa em frequência de mutantes por 10^5 sobreviventes ($FM/10^5$).

Tabela 14 - Frequência de mutação expressa por massa de extrato orgânico (frequência de mutantes $\times 10^5/\mu\text{g}$) e concentração mínima efetiva (CME) para as amostras atmosféricas procedentes do Parque D.Pedro (PDP), Pinheiros (PIN) e Cubatão (CP), obtida pelo ensaio de mutação direta em *Salmonella typhimurium*.

Estação	TM677	PDP		PIN		CP	
		Freq. mutantes $\times 10^{-5}/\mu\text{g} \pm \text{DP}^1$	CME (μg)	Freq. mutantes $\times 10^{-5}/\mu\text{g} \pm \text{DP}^1$	CME (μg)	Freq. mutantes $\times 10^{-5}/\mu\text{g} \pm \text{DP}^1$	CME (μg)
INVERNO	-S9	nc	-	0,11 \pm 0,01	31,18	nc	-
	+S9	nd	-	nd	-	0,08 \pm 0,01	141,87
PRIMAVERA	-S9	0,25 \pm 0,04	nc	1,18 \pm 0,07	nc	1,73 \pm 0,35	nc
	+S9	nd	-	0,05 \pm 0,01	121,60	0,19 \pm 0,04	19,21
VERÃO	-S9	1,27 \pm 0,17	nc	1,30 \pm 0,17	nc	0,74 \pm 0,16	17,88
	+S9	0,09 \pm 0,03	45,11	0,13 \pm 0,01	19,54	0,27 \pm 0,06	10,78
OUTONO	-S9	0,50 \pm 0,13	117,86	nd	-	0,98 \pm 0,15	113,79
	+S9	3,16 \pm 0,19	9,57	0,81 \pm 0,17	56,49	0,34 \pm 0,10	67,53

1 - DP: desvio padrão
nc: não calculável

nd: não detectado
italico: indícios de mutagenicidade

Tabela 15 - Frequência de mutação expressa em volume de ar (frequência de mutantes $\times 10^{-5}/m^3$) e concentração mínima efetiva (CME) para as amostras atmosféricas procedentes do Parque D.Pedro (PDP), Pinheiros (PIN) e Cubatão (CP), obtida pelo ensaio de mutação direta em *Salmonella typhimurium*.

Estação	TM677	PDP		PIN		CP	
		Freq. mutantes $\times 10^{-5}/m^3 \pm DP^1$	CME (m^3)	Freq. mutantes $\times 10^{-5}/m^3 \pm DP^1$	CME (m^3)	Freq. mutantes $\times 10^{-5}/m^3 \pm DP^1$	CME (m^3)
INVERNO	-S9	nc	-	0,70 \pm 0,06	4,87	nd	-
	+S9	nd	-	nd	-	0,34 \pm 0,04	33,79
PRIMA VERA	-S9	3,00 \pm 0,48	nc	13,10 \pm 0,78	nc	8,82 \pm 1,79	nc
	+S9	nd	-	0,56 \pm 0,11	10,95	0,97 \pm 0,20	3,76
VERÃO	-S9	12,32 \pm 1,65	nc	4,94 \pm 0,65	nc	3,18 \pm 0,69	4,16
	+S9	0,87 \pm 0,29	4,65	0,49 \pm 0,04	5,13	1,16 \pm 0,26	2,51
OUTONO	-S9	4,35 \pm 1,13	13,55	nd	-	4,41 \pm 0,68	15,00
	+S9	27,49 \pm 1,65	1,10	4,37 \pm 0,92	10,46	1,53 \pm 0,45	25,29

1- DP: desvio padrão
nc: não calculável

nd: não detectado
italico: indícios de mutagenicidade

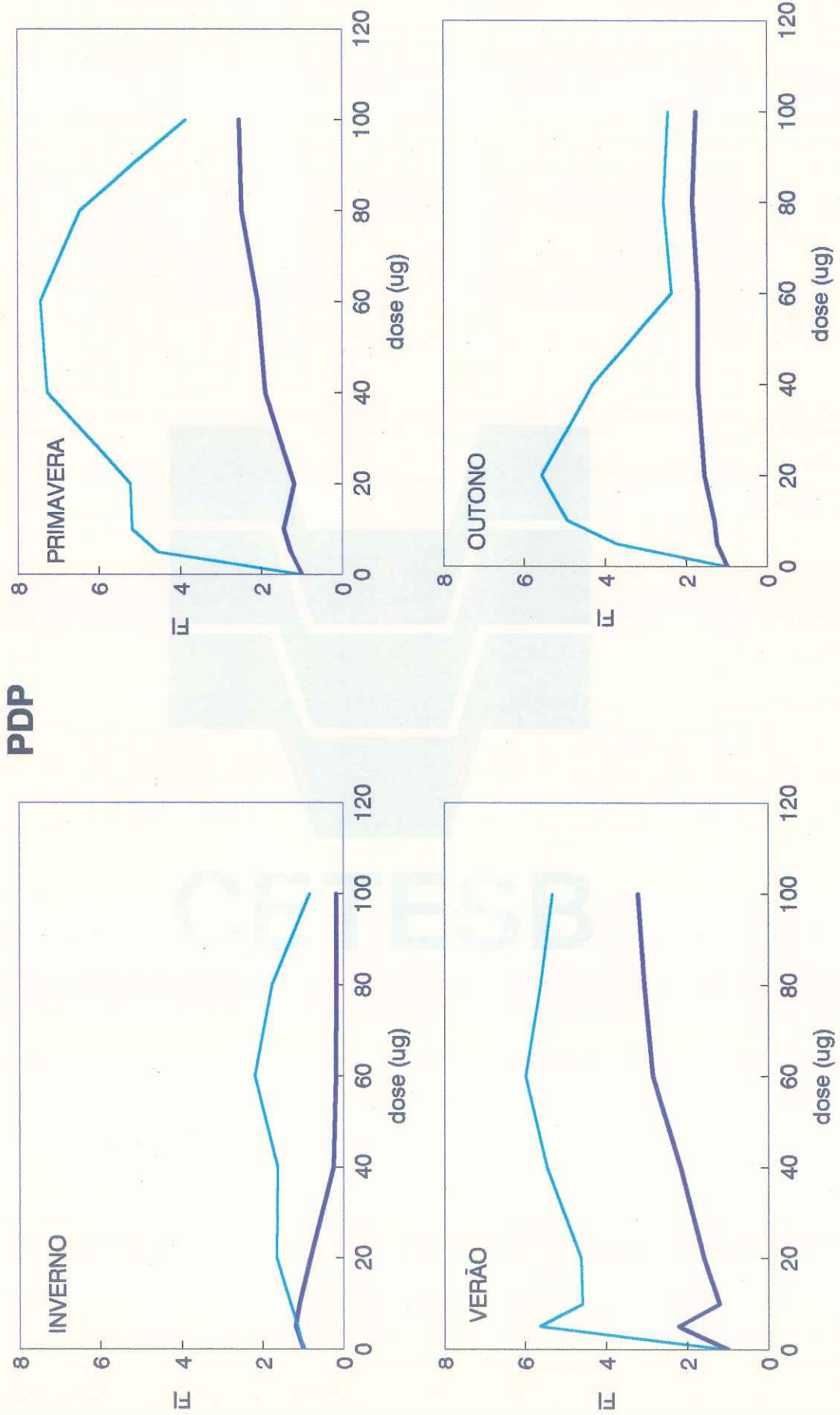


Figura 23 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos dos "pools" de material particulado de ar procedente do Parque D.Pedro (PDP), no ensaio SOS Cromoteste na presença (-----) e ausência (—) de ativação metabólica expressa em fator de indução (FI).

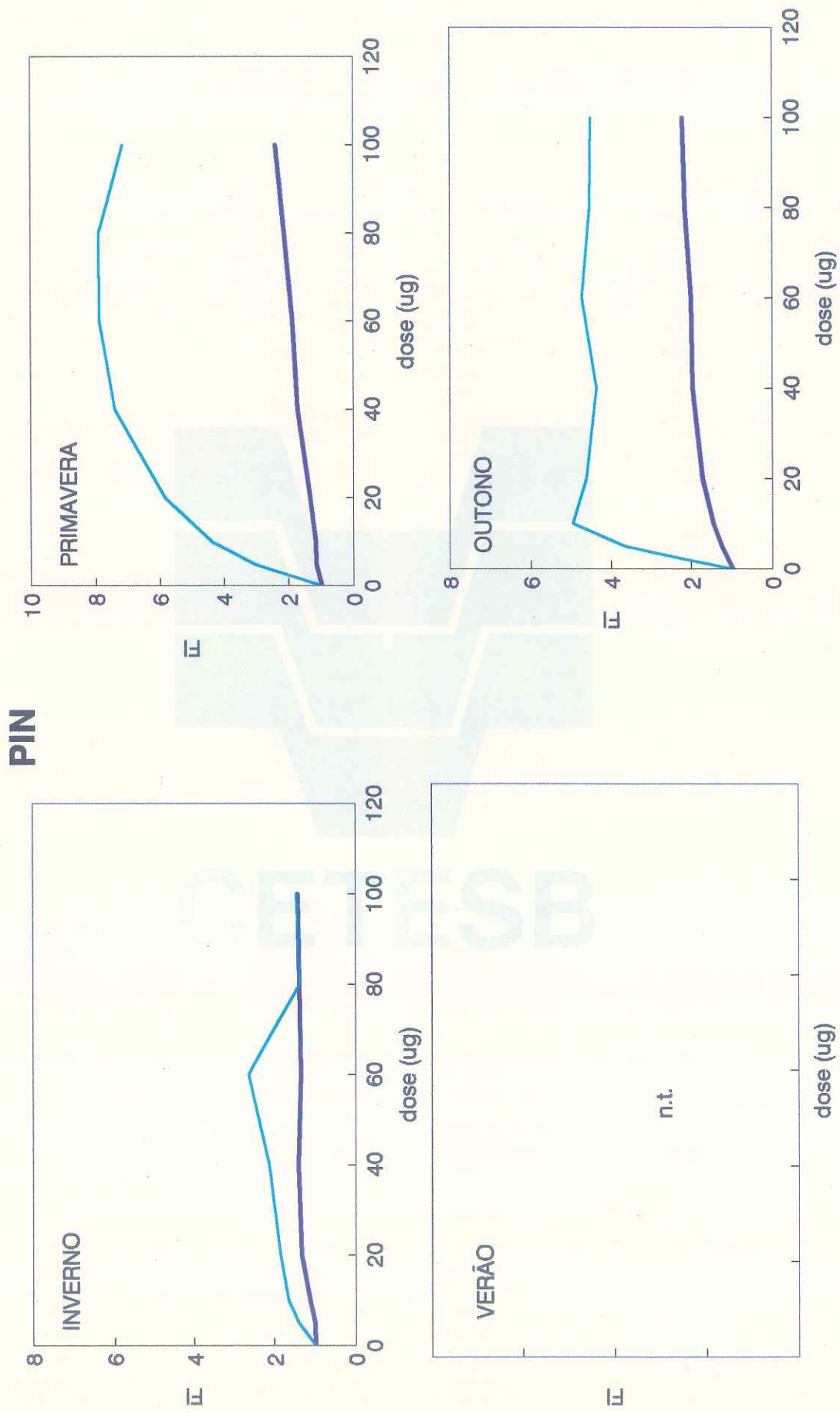


Figura 24 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos dos "pools" de material particulado de ar procedente de Pinheiros (PIN), no ensaio SOS Cromoteste na presença (-----) e ausência (—) de ativação metabólica expressa em fator de indução (FI).

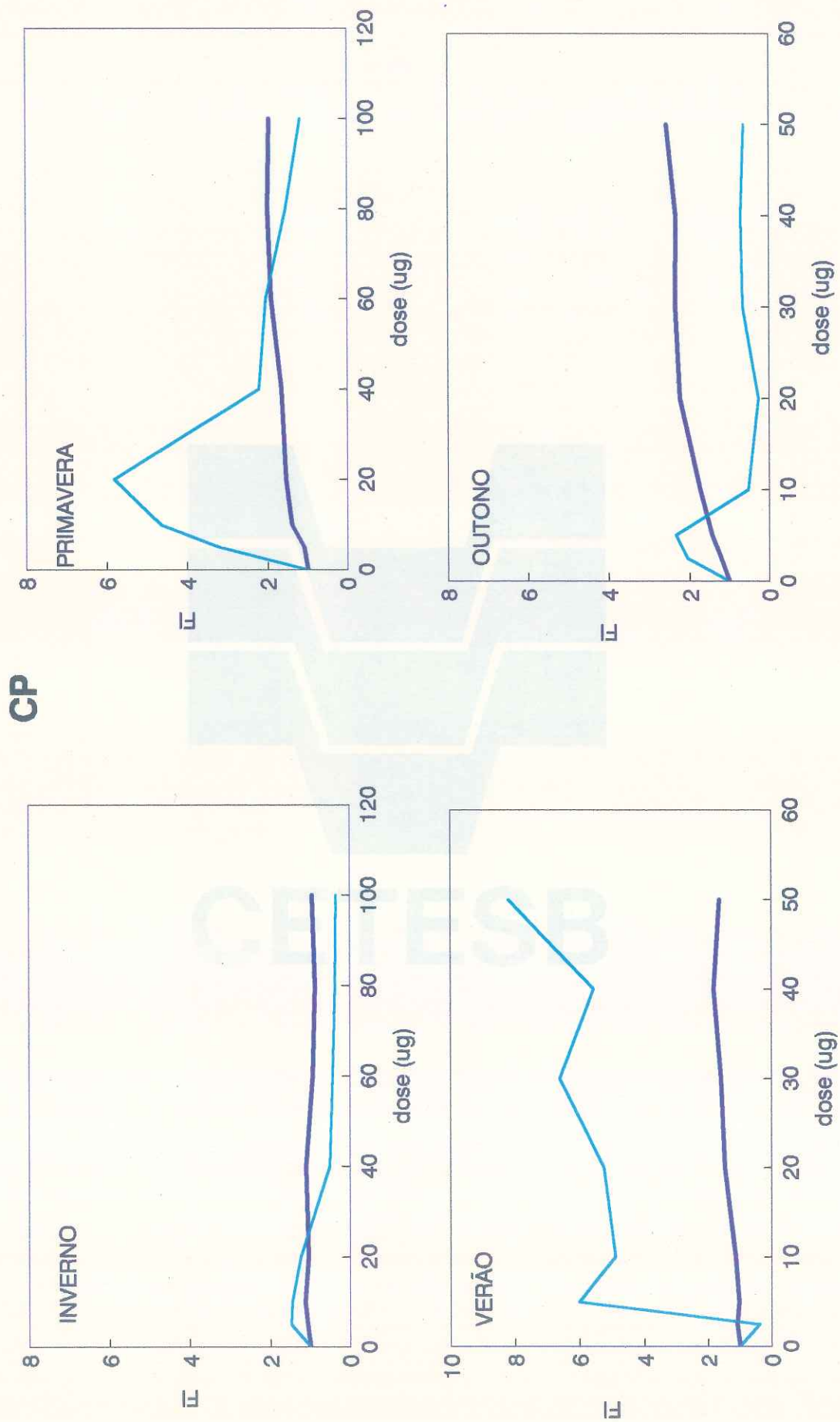


Figura 25 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos dos "pools" de material particulado de ar procedente de Cubatão (CP), no ensaio SOS Cromoteste na presença (-----) e ausência (—) de ativação metabólica expressa em fator de indução (FI).

Tabela 16 - Atividade genotóxica expressa em fator de indução no sistema de reparo SOS por massa de extrato orgânico e em volume de ar (SOSIP/ µg e SOSIP/ m³) e concentração mínima efetiva (CME) para as amostras atmosféricas procedentes do Parque D.Pedro (PDP), Pinheiros (PIN) e Cubatão (CP), obtida pelo ensaio SOS Cromoteste.

Estação	PQ37	PDP				PIN				CP			
		SOSIP/ µg	CME (µg)	SOSIP/ m³	CME (m³)	SOSIP/ µg	CME (µg)	SOSIP/ m³	CME (m³)	SOSIP/ µg	CME (µg)	SOSIP/ m³	CME (m³)
INVERNO	-S9	0,02	57,28	0,28	3,95	0,02	53,01	0,15	8,28	<i>nd*</i>	-	-	-
	+S9	<i>nd</i>	-	<i>nd</i>	-	<i>nd</i>	-	<i>nd</i>	-	<i>nd*</i>	-	-	-
PRIMAVERA	-S9	<i>nc</i>	-	<i>nc</i>	-	0,23	7,18	2,54	0,65	0,15	14,46	0,75	2,84
	+S9	0,01	80,11	0,18	6,68	0,01	97,47	0,13	8,86	0,01	79,68	0,07	15,62
VERÃO	-S9	<i>nc</i>	-	<i>nc</i>	-	<i>nt</i>	-	<i>nt</i>	-	<i>nc</i>	-	-	-
	+S9	0,02	50,85	0,22	5,24	<i>nt</i>	-	<i>nt</i>	-	<i>nc</i>	-	-	-
OUTONO	-S9	<i>nc</i>	-	<i>nc</i>	-	<i>nc</i>	-	<i>nc</i>	-	0,27	4,17	1,22	0,93
	+S9	0,01	127,40	0,08	14,64	0,01	122,38	0,06	22,66	0,03	43,32	0,13	9,63

nd: não detectado

*nd**: não detectado devido a toxicidade

nc: não calculável

nt: não testado

PDP

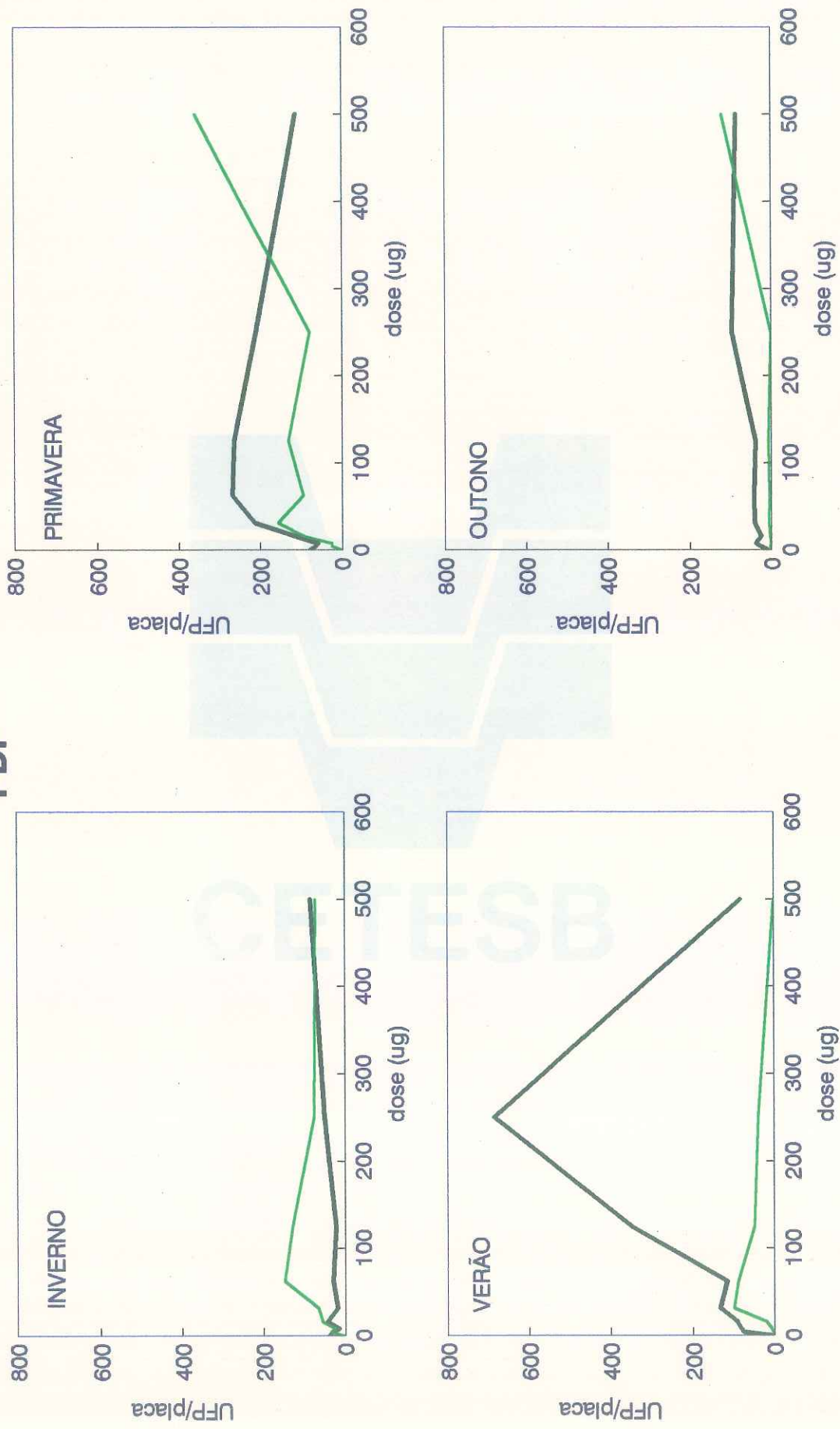


Figura 26 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos dos "pools" de material particulado de ar procedente do Parque D. Pedro (PDP), no ensaio Induteste na presença (-----) e ausência (—) de ativação metabólica expressa em unidades formadoras de placa de lise por placa (UFP/ placa).

PIN

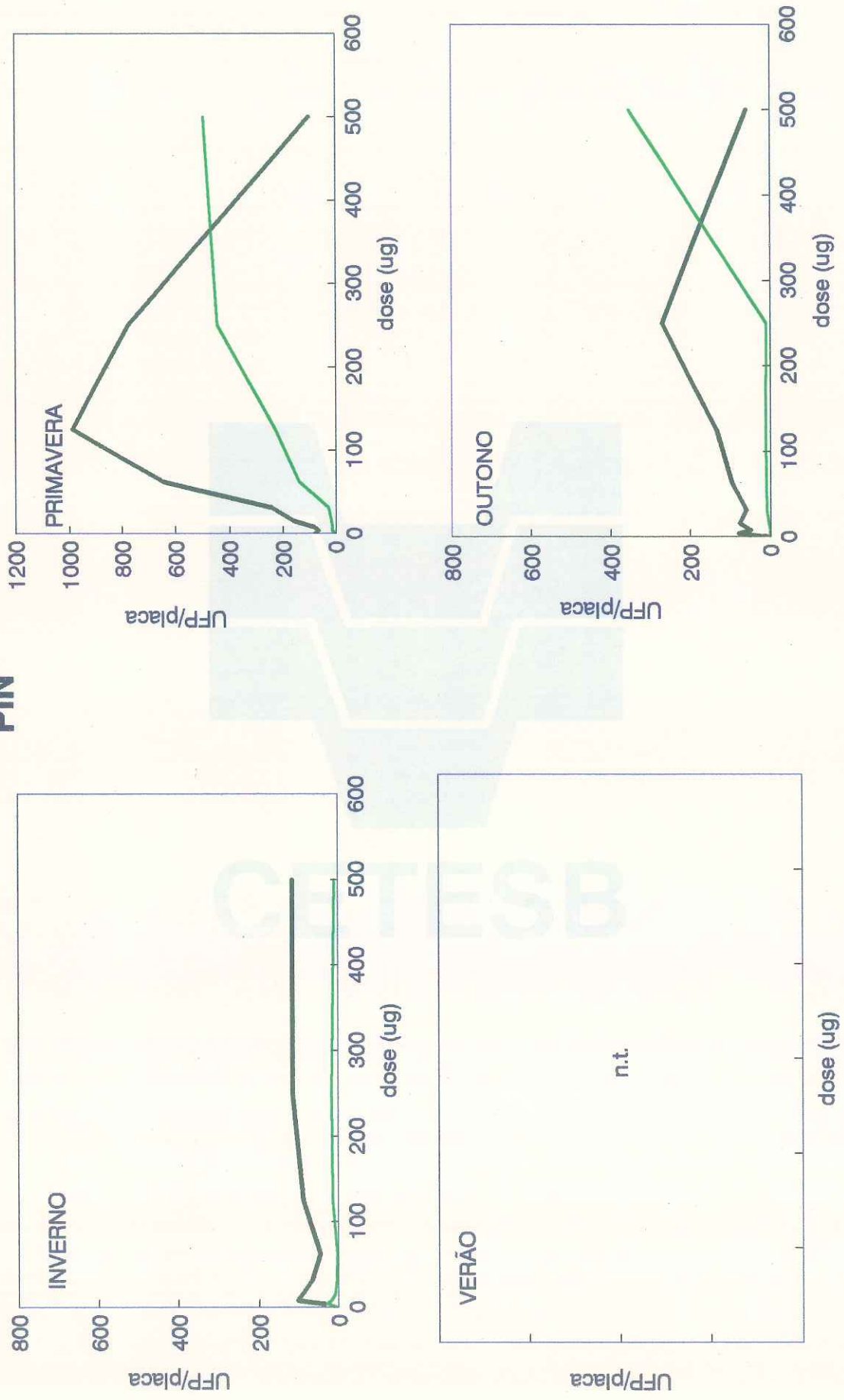


Figura 27 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos dos "pools" de material particulado de ar procedente de Pinheiros (PIN), no ensaio Induteste na presença (-----) e ausência (—) de ativação metabólica expressa em unidades formadoras de placa de lise por placa (UFP/placa).

CP

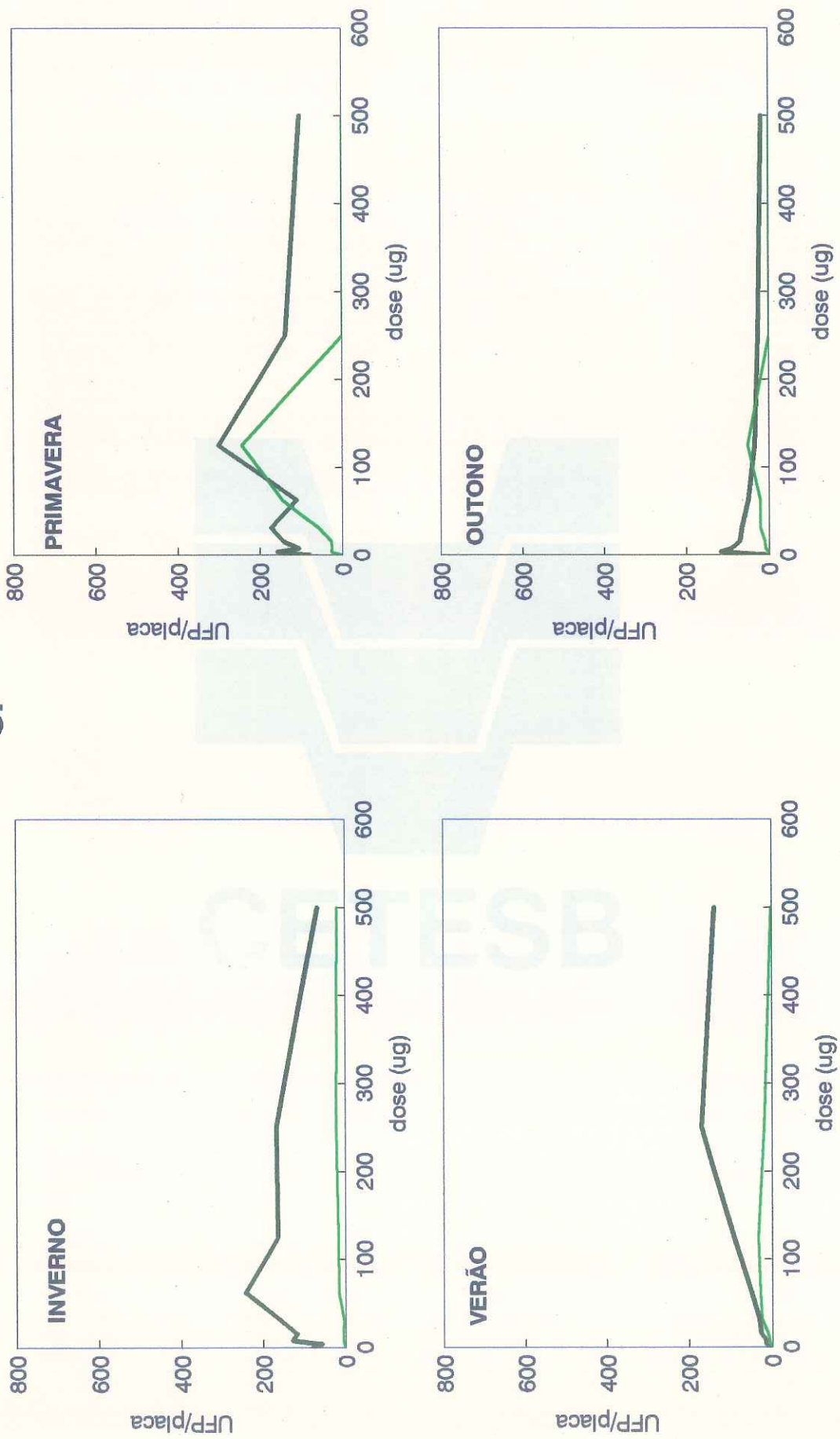


Figura 28 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos dos "pools" de material particulado de ar procedente de Cubatão (CP), no ensaio Induteste na presença (---) e ausência (—) de ativação metabólica expressa em unidades formadoras de placa de lise por placa (UFP/ placa).

Tabela 17 - Unidades formadoras de placas expresso por massa de extrato orgânico e em volume de ar (UFP/ µg e UFP/ m³) e concentração mínima efetiva (CME) para as amostras atmosféricas procedentes do Parque D.Pedro (PDP), Pinheiros (PIN) e Cubatão (CP), obtidas pelo ensaio Induteste.

Estação	WP2	PDP				PIN				CP			
		UFP/ µg	CME (µg)	UFP/ m³	CME (m³)	UFP /µg	CME (µg)	UFP/ m³	CME (m³)	UFP/ µg	CME (µg)	UFP/ m³	CME (m³)
INVERNO	-S9	2,08	7,50	30,16	0,52	nc	-	nc	-	0,04	210,38	0,19	41,25
	+S9	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
PRIMAVERA	-S9	nc	-	nc	-	1,08	35,53	11,87	3,23	nc	-	nc	-
	+S9	nd	-	nd	-	nc	-	nc	-	nd	-	nd	-
VERÃO	-S9	nc	-	nc	-	nt	-	nt	-	0,26	27,52	1,17	6,11
	+S9	2,53	18,54	24,54	1,91	nt	-	nt	-	0,63	19,48	2,84	4,33
OUTONO	-S9	nc	-	nc	-	nc	-	nc	-	0,38	9,19	1,72	2,04
	+S9	nc	-	nc	-	nc	-	nc	-	nc	-	nc	-

nd: não detectado

nc: não calculável

nt: não testado

Tabela 18 - Comparação da sensibilidade da resposta mutagênica obtida no teste de Kado e no teste de Ames, para amostras de extrato orgânico de material particulado de ar procedentes do Parque D. Pedro (PDP), Pinheiros (PIN) e Cubatão (CP).

AMOSTRA		Razão KADO/AMES (revertentes/ μ g)			
		TA98		TA100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
PDP	Inverno	7,7	9,4	1,1	1,0
	Primavera	7,1	2,0	3,6	7,7
	Verão	13,0	3,2	5,7	4,1
	Outono	9,0	4,2	1,8	1,1
PIN	Inverno	10,7	4,3	2,4	2,6
	Primavera	5,0	0,5	7,3	8,6
	Verão	8,1	1,7	-	-
	Outono	9,8	4,3	7,6	2,3
CP	Inverno	24,0	12,7	-	1,7
	Primavera	7,6	3,5	20,2	4,3
	Verão	7,7	1,1	-	-
	Outono	14,2	12,5	-	-
média		10,3	5,0	6,2	3,7
desvio padrão		4,8	4,1	5,8	2,6
Mediana		8,6	3,9	4,7	2,6

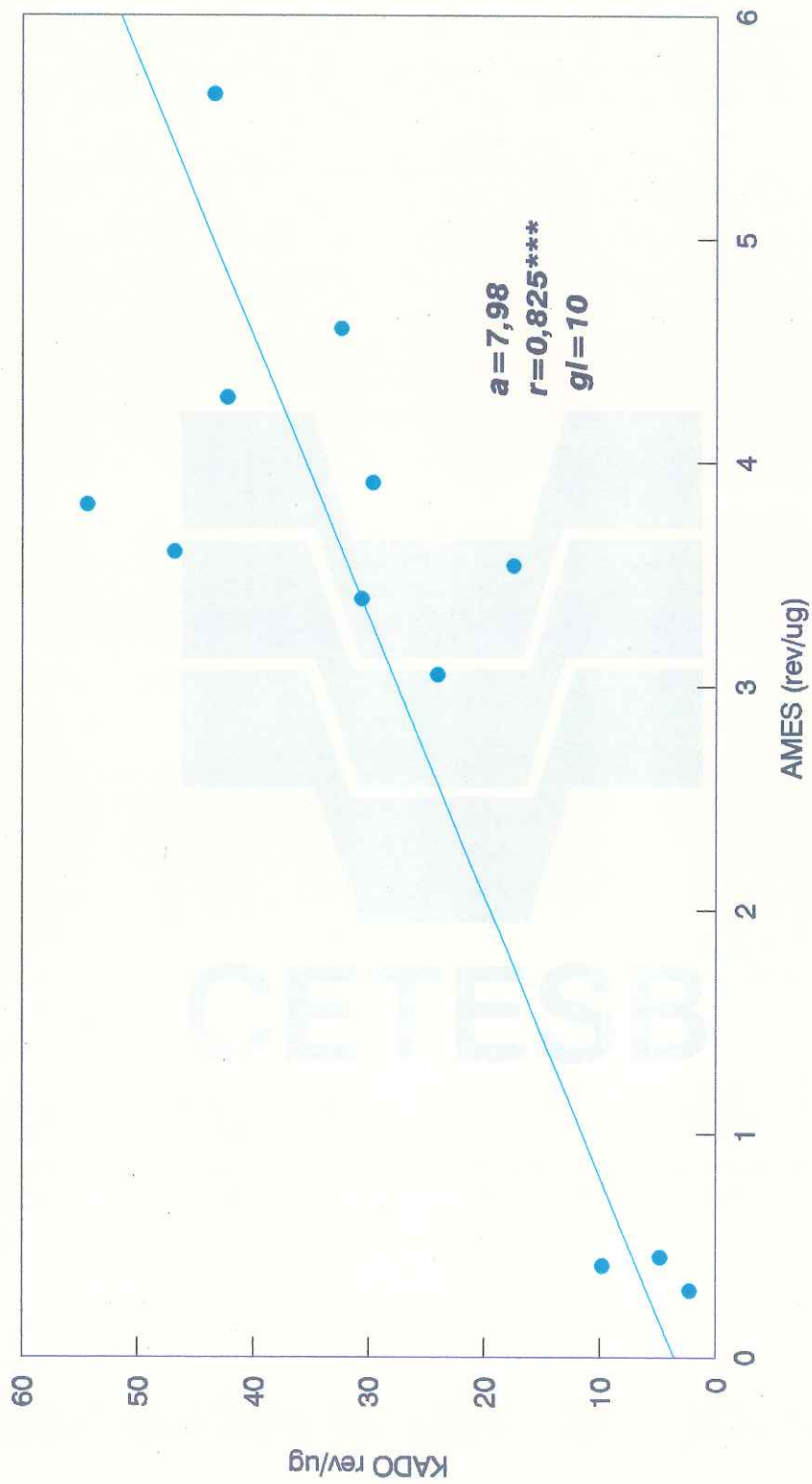


Tabela 19 - Comparação entre os testes de Kado, Ames, Mutação Direta, Cromoteste e Induteste através da concentração mínima efetiva (CME) em m³ de ar.

TESTE	N	CME (m ³)		
		MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
Kado	77	1,5	0,06	11,53
Ames	47	6,8	0,36	58,14
Mutação Direta	13	5,1	1,10	33,80
Cromoteste	12	7,5	0,65	22,66
Induteste	7	3,2	0,52	41,25



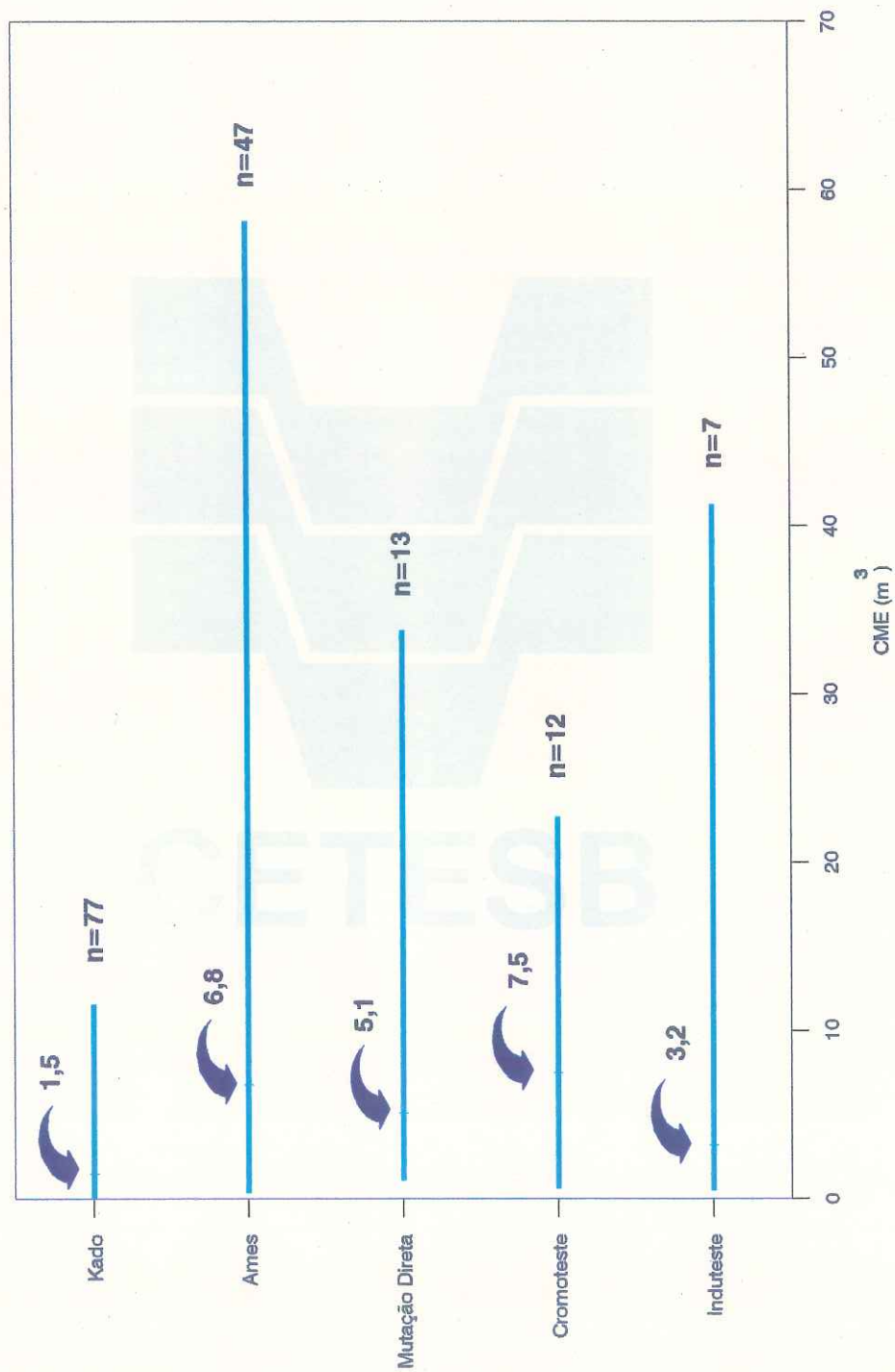


Figura 30 - Representação gráfica da mediana e valores máximos e mínimos de CME obtidos para os cinco bioensaios avaliados.

4. EQUIPAMENTOS ADQUIRIDOS

- . Centrífuga refrigerada marca Beckman, modelo J 2 - HS com velocidade de até 21.000 rpm, dois rotores de ângulo fixo (JA201 e JA20) e os respectivos tubos e adaptadores.
- . Incubadora com agitador rotatório marca New Brunswick, modelo G24, com plataformas para frascos de 125 mL e tubos de 10 mL.
- . Dosador automático de placas de Petri, marca New Brunswick, modelo Pourmatic MP320 e esterilizador automático de Ágar, modelo Agarmatic AS-3 e acessórios.

5. TREINAMENTO EXTERNO

5.1. Funcionária: Gisela Umbuzeiro Valent

Período: 19.11 a 16.12.1990

Instituições visitadas: Center for Life Science and Toxicology, RTI, RTP, NC,
USA

. Genetic Toxicology Division, HERL, EPA, NC, USA

. Environmental Research Health and Testing, RTP, NC,
USA

. National Institute of Environmental Health Sciences, RTP,
NC, USA

5.2. Funcionária: Maria Inês Zanoli Sato

Período: 06 a 11.04.1991

Instituições visitadas: University of California, Irvine, CA, USA

. University of California, Riverside, CA, USA

. Orange County Water Distric, CA, USA

Participação em congresso: 22nd Annual Meeting of the Environmental Mutagen
Society, FL, USA

6. CONSULTORIA

6.1. Internacional

Consultor: Larry D. Claxton

Instituição: Genetic Toxicology Divison, HERL, EPA, RTP, NC, USA

Período: 26.09 a 01.10.93

Atividades desenvolvidas:

- . Apresentação da CETESB e do projeto
- . Visita ao centro de São Paulo e Cubatão
- . Discussão sobre os dados do projeto
- . Discussão sobre os seguintes assuntos:
 - Legislação - Teste de genotoxicidade
 - Antimutagenicidade - Significado
 - Controle de qualidade em laboratório de mutagênese
 - Normas de segurança em laboratório de mutagênese
 - Resíduos sólidos - melhor "approach"
 - Biorremediação
 - Carga genotóxica
 - Importância das técnicas de biologia molecular como complemento dos ensaios tradicionais.
- . Palestra: "New trends in the Genetic Toxicology field"

7. COMENTÁRIOS SOBRE O PROJETO CONCLUÍDO

O desenvolvimento deste projeto através de financiamento do Banco Mundial/ Governo do Estado permitiu a atualização do instrumental analítico dos laboratórios da CETESB, na área de genotoxicidade ambiental aplicada à avaliação de amostras atmosféricas.

As metodologias implantadas, bem como a caracterização da genotoxicidade presente nas amostras analisadas se mostraram instrumentos de grande importância no controle e monitoramento dos poluentes antropogênicos, tanto de origem industrial como de emissões veiculares, que são lançados na região metropolitana de São Paulo e Cubatão.

Os treinamentos de curta duração e a consultoria do especialista da USEPA, permitiram o conhecimento do estado da arte dessas análises nos EUA e o estabelecimento de uma linha de comunicação científica permanente entre a CETESB e as instituições visitadas gerando benefícios mútuos.

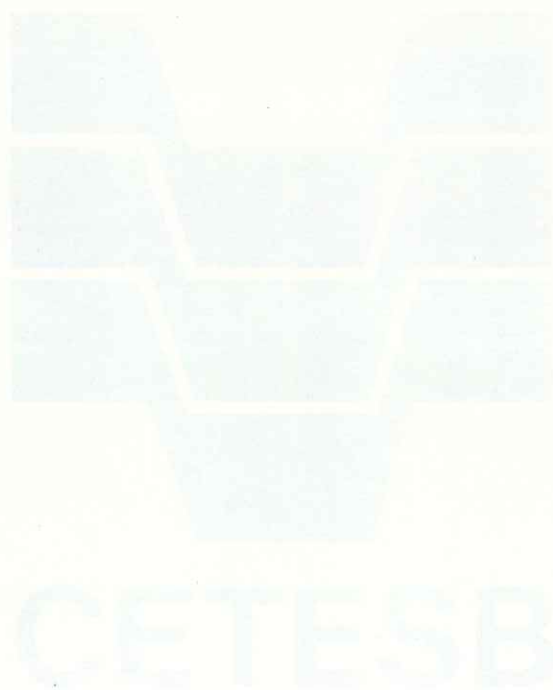
Além disso, através deste projeto equipamentos eficientes e modernos foram adquiridos a preços de mercado internacional e sem impostos, viabilizando e agilizando as análises.

Analisando os dados obtidos observa-se que os objetivos propostos foram atingidos, levando a conclusões e recomendações relevantes e compreensivas, que podem auxiliar não só nas ações de controle como também na identificação das possíveis fontes de poluição com atividade genotóxica, sempre com intuito de minimizar e prevenir os danos que esses poluentes podem causar a saúde das populações expostas.

É importante ressaltar que são projetos desse nível, tecnicamente objetivos e integrados as necessidades da Companhia, que vem auxiliando os laboratórios da CETESB a se manter como referência da OMS para a América Latina e sua posição de destaque na área de controle de poluição em todo o Brasil.

8. RESUMO DO PROJETO CONCLUÍDO

Ver item 3.1.



Data:

Coordenador do Projeto

nome: Petra Sanchez Sanchez

assinatura: 

Data:

Coordenador do Procop

nome: Luis Carlos da Costa

assinatura: 



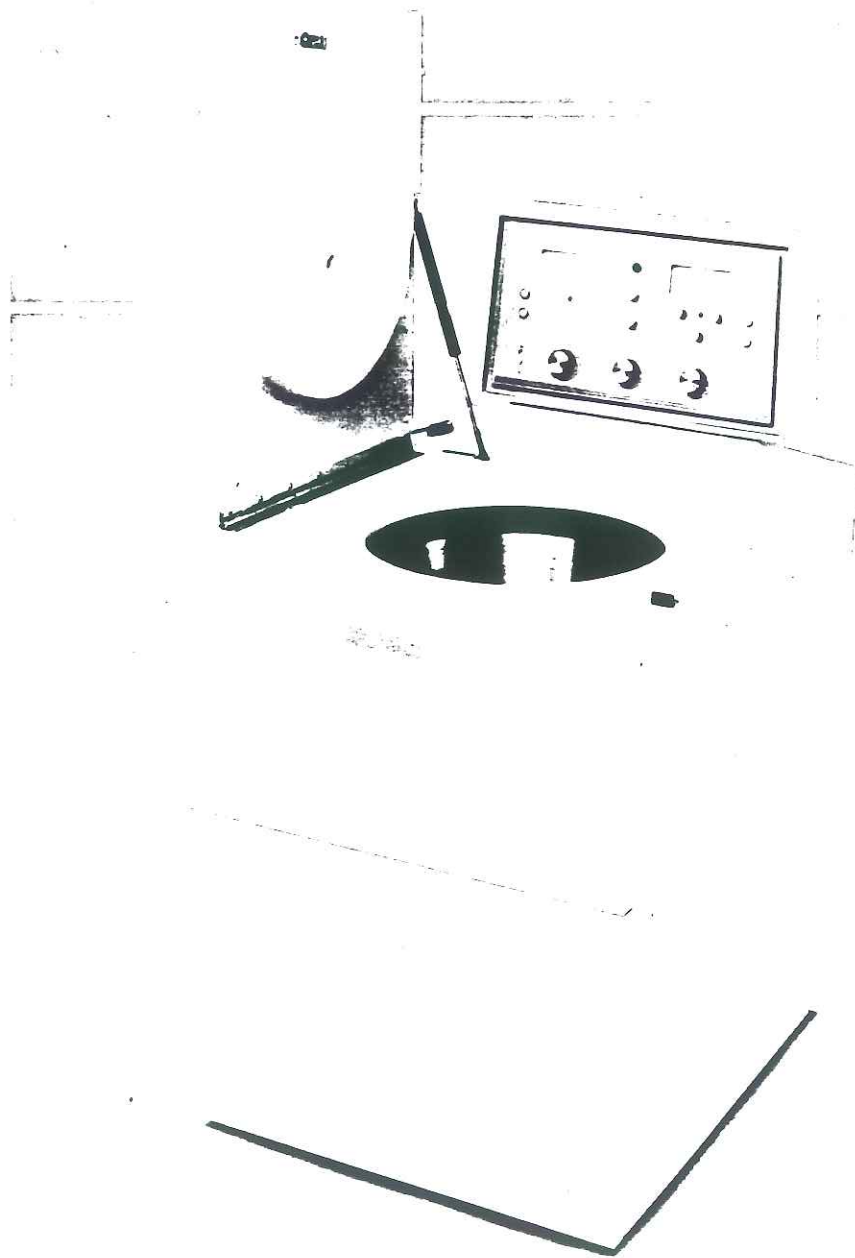


ANEXO 1: EQUIPAMENTOS ADQUIRIDOS

BECKMAN

Model J2-HS Centrifuge

Instruction Manual



PUBLISHED BY SPINCO BUSINESS UNIT OF BECKMAN INSTRUMENTS, INC., PALO ALTO, CALIFORNIA 94304

Preço do equipamento + acessórios = US\$18,342.00

Patrimônio: B - 05840



Guide to Operations

**ENVIRONMENTAL
INCUBATOR
SHAKER
MODEL G-24
WITH DIGITAL DISPLAY**

MANUAL NO.: M1036-0051/D



NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO., INC.

BOX 4005 . 44 TALMADGE ROAD . EDISON, NJ 08818-4005 . 908-287-1200
TELEPHONE: 800-631-5417 . FAX: 908-287-4222 . TELEX: 4753012 NBSCO

Preço do equipamento + acessórios = US\$5,316.50

Patrimônio: B - 05843



Guide to Operations

MODEL MP-320 AUTOMATIC PETRI DISH FILLER

MANUAL NO.: M1107-0050/D



NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO., INC.

BOX 4005 . 44 TALMADGE ROAD . EDISON, NJ 08818-4005 . 908-287-1200
TELEPHONE: 800-631-5417 . FAX: 908-287-4222 . TELEX: 4753012 NBSCO

Preço do equipamento + acessórios = US\$21,670.00

Patrimônio: B - 05842

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL
BIBLIOTECA

ANEXO 2: TREINAMENTO EXTERNO

CETESB



CETESB

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

PROCOP

**PROGRAMA DE CONTROLE DE POLUIÇÃO
PROGRAMA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA**

PROJETO

**Avaliação da Genotoxicidade de material
particulado de ar em áreas industriais
e urbanas do Estado de São Paulo - atra
vés de Bioensaios Microbianos.**

Nº DA O.S. - 35.16.00

ÁREA

**SETOR DE MICROBIOLOGIA
DIVISÃO DE ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE APOIO OPERACIONAL
DIRETORIA DE NORMAS E PADRÕES AMBIENTAIS**

PROCOP

**RELATÓRIO TÉCNICO DE VIAGEM
BIÓL. GISELA U. VALENT
RESEARCH TRIANGLE PARK, NC, USA**

19 nov. a 16 dez. de 1990

1. Objetivos

Obter informações técnicas e científicas e treinamento prático especializado em:

- Novas metodologias para detecção de atividade genotóxica em amostras de ar utilizando-se bioensaios microbianos.
- Procedimentos de extração e concentração de amostras ambientais.
- Procedimentos de segurança em laboratórios de mutagênese.

2. Instituições Visitadas e Atividades Desenvolvidas.

2.1. Center for Life Science and Toxicology
Research Triangle Institute - RTI
Research Triangle Park, NC 27709, USA
telefone: 919 - 541-6516
fax: 919 - 541-6499

Coordenador: Dr. Frederick De Serres, Ph.D.
Diretor do Center for Life Science and
Toxicology

Período: 20 a 26 de Novembro de 1990.

Características: Instituto de pesquisa, criado em 1958, de natureza privada que realiza projetos em várias áreas através de contratos.

Atividades realizadas: O treinamento se realizou no laboratório de Toxicologia Molecular sob orientação da Dra. Linda Niedziela. O laboratório realiza o teste de Ames para detecção de mutagenicidade de amostras ambientais, compostos químicos puros e formulações, além de outros ensaios com roedores, "in vivo" e com culturas celulares. Durante o treinamento discutimos aspectos práticos do teste de Ames que nos ajudarão no aprimoramento desse ensaio já realizado em nosso laboratório e no controle de qualidade dos dados por nós gerados. A Dra. Linda também sugeriu a implantação em nosso laboratório de outros ensaios de mutagenicidade utilizando culturas celulares, como a CHO, para investigação de troca de cromátides irmãs ou micronúcleos com o objetivo de complementar a análise das amostras de ar do ponto de vista de genotoxicidade.

Durante o treinamento conversamos com o Dr. Frederick De Serres, coordenador do treinamento, e nos foi sugerido a implantação de um ensaio denominado Dano recessivo letal com *Neurospora crassa*, devido a grande diversidade de respostas que esse teste fornece,

da simplicidade de execução e do extensivo estudo já realizado com diversas classes de compostos químicos.

Nesta mesma Instituição tivemos a oportunidade de conversar com o Dr. Edo Pellizzari do Analytical and Chemical Sciences Laboratory quando discutimos alguns aspectos na área de preservação de amostras e artefatos gerados durante a coleta de material particulado de ar e detalhes dos métodos de extração por ultrasonicação tanto utilizado para amostras de ar como de sedimentos. Na ocasião foi levantada a necessidade de análises químicas integradas aos ensaios de genotoxicidade para um melhor entendimento das possíveis fontes poluidoras e melhor interpretação dos resultados.

Outro pesquisador contactado foi o Dr. Lawrence Myers do Center for Medical, Environmental and Energy Statistics também do RTI, e com ele, discutimos a respeito da utilização do software "Salmonel", por ele desenvolvido e que vem sendo utilizado em nosso laboratório desde 1988. Várias considerações foram feitas sobre a aplicação deste programa concluindo-se que o mesmo é bastante adequado para a análise estatística de resultados tanto do teste de Ames como do Teste de Kado. Inclusive nos foi doado pelo referido pesquisador uma versão atualizada do programa.

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL
BIBLIOTECA

2.2. Genetic Toxicology Division

Health Effects Research Laboratory - HERL

Environmental Protection Agency - EPA

Research Triangle Park, NC, 27711, USA

fone: 919 - 541-2329

fax: 919 - 541-0968

Coordenador: Dr. Larry D. Claxton, Ph.D.

Genetic Bioassay Branch

Período: 27 de novembro à 14 de dezembro de 1990.

Características: A divisão de Genética Toxicológica está sob direção da Dra. Joellen Lentas e desenvolve vários projetos na área de genotoxicidade de amostras ambientais utilizando testes "in vitro" de curta duração, especialmente amostras de ar e resíduos industriais.

Atividades realizadas: Foram vários os pesquisadores contatados e o assunto estudado com cada um deles será descrito a seguir:

a) Dr David DeMarini - assunto: PCR, sequenciamento direto de DNA e hibridização de colonias com sondas para caracterização do espectro mutacional do alelo hisD3052 de *Salmonella typhimurium*.

Com o Dr David e sua equipe foi possível obter treinamento prático em laboratório nessas metodologias, além de bibliografias recentes sobre o assunto. Essas metodologias foram criadas devido ao fato do teste de Ames vir sendo amplamente empregado para detecção de milhares de compostos químicos, porém por se tratar de um ensaio microbiano, as comparações entre os resultados deste ensaio e os riscos potenciais a organismos superiores são ainda objeto de controvérsia por alguns autores. Desta maneira, através destas técnicas é possível elucidar os mecanismos moleculares dos eventos de reversão genica causados pelos diferentes agentes cancerígenos fornecendo dados valiosos para o entendimento da relação entre mutagenese bacteriana e o potencial oncogênico

desses agentes em organismos superiores.

. Técnica de PCR e sequenciamento direto: A técnica se baseia na reação de cadeia de polimerase (PCR) para acelerar o processo de análise do DNA dos revertentes de *S. tybimurium* TA98. Extrato total de DNA de um única colônia é preparado e utilizado para amplificação de um fragmento de 328 pares de bases, contendo a mutação hisD3052 no centro. Após ultrafiltração o DNA obtido é sequenciado.

. Técnica de hibridização de colônias com sondas: Devido à alta porcentagem de revertentes que apresentam uma deleção de CG, o método de hibridização de colônias com sondas foi desenvolvido e se baseia na transferência de colônias his^r crescidas em meio BHI para papel de filtro e após tratamento do DNA este é hibridizado com a sonda TCS que contém uma deleção CG no gene hisD3052.

Estas técnicas envolvem materiais especiais e equipamentos de alta sofisticação, podendo talvez serem implantadas a médio prazo em nosso laboratório. A utilização desta técnicas forneceriam informações importantes à nível molecular auxiliando o entendimento do papel do mutágenos presentes nas amostras ambientais nos processos cancerígenos e do risco potencial à saúde humana.

b) Dr. Larry Claxton assunto: Testes de genotoxicidade com microrganismos - técnicas e interpretação dos resultados.

Com o Dr. Larry Claxton foram discutidos diversos aspectos em relação a:

. Extração e concentração de amostras - Dentre as diferentes metodologias existentes, o método de ultrasonicação tem sido considerado a melhor técnica para material particulado de ar, utilizando-se diclorometano como solvente. Protocolos detalhados nos foram fornecidos. Tivemos a oportunidade de realizar uma extração de amostras da Grande São Paulo o que nos permitiu observar alguns detalhes importantíssimos para o controle de qualidade de nossas atividades. Nesta etapa contamos com a valiosa ajuda do

Químico Ron Willians. Foram também observados detalhes sobre segurança química na manipulação de amostras de ar, desde o recebimento da amostra até o preparo do extrato para teste.

. Testes de Genotoxicidade: Os testes utilizados pelos pesquisadores daquele laboratório são principalmente o Teste de Ames, Teste de Kado, e em alguns casos Spiral Test e Induteste. Vários detalhes técnicos sobre os ensaios que já realizamos em nosso laboratório foram discutidos, inclusive à nível de segurança laboratorial. Pudemos realizar um teste de Kado com as amostras da Grande São Paulo anteriormente extraídas e os resultados obtidos se encontram na Tabela 1. A interpretação dos resultados gerados pelo teste de Ames e teste de Kado foi exaustivamente discutida, inclusive baseada em dados já obtidos no nosso laboratório. Várias idéias surgiram as quais com certeza enriquecerão sobremaneira a interpretação dos resultados obtidos em nosso projeto.

Tabela 1 - Resultados do teste de Kado das amostras procedentes do Parque Dom Pedro, São Paulo e Vila Parisi, Cubatão.

Data da Coleta	No da amostra	Procedência	Teste de Kado	
			ng reverentes/ug de MOE*	ng reverentes/ug de MOE*
			TA98-S9	TA98+S9
26/2/89	PDP375	Parque Dom Pedro	8,2	4,8
10/3/89	PDP377	Parque Dom Pedro	17,8	4,2
20/2/89	CP925	Vila Parisi	16,6	8,1

*MOE - material orgânico extraído.

c) Dra. Virginia Houk - assunto: Resíduos sólidos e efluentes industriais.

A Dra. Virginia tem uma vasta experiência na análise de genotoxicidade de resíduos sólidos e efluentes industriais e pode nos fornecer alguns trabalhos sobre a área de grande interesse para CETESB, para aproveitamento em futuros projetos.

2.3. Environmental Research Health and Testing (EHRT)

PO BOX 12199

Research Triangle Park, NC 27709, USA

fone: 919 - 544-1792

Contacto: Dr. Thomas Hughes

Chefe do Departamento de Genética Toxicológica

Data da visita: 03/12/90

O EHRT é um empresa privada, relativamente pequena, contando com 180 funcionários cuja especialidade são testes de toxicidade "in vitro" e "in vivo" com filiais em várias cidades dos EUA. A empresa fornece consultoria e realiza projetos e testes por contratos.

O objetivo de nossa visita à instituição foi o de conhecer e conversar com o Dr. Thomas Hughes, que tem uma enorme experiência em Teste de Ames de amostras de ar. Alguns detalhes técnicos foram discutidos e também formas de expressão de resultados do teste de Ames e de Kado. O Dr. Hughes gentilmente nos forneceu bibliografia com resultados de um estudo interlaboratorial conduzido pela EHRT e EPA com vários compostos químicos de referência, cujos resultados serão muito úteis para comparação com dados gerados em nosso laboratório.

2.4. National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)
Research Triangle Park, NC 27709, USA
fone: 919 - 541-4482

Contacto: Dr. Errol Zeiger
Chefe do Grupo de Mutagenese do Setor de
Toxicologia Experimental

Data da visita: 11/12/90

Tivemos a oportunidade de visitar os laboratórios deste Instituto através de contacto com o Dr. Errol Zeiger. O grupo que este pesquisador gerencia é responsável pela análise de centenas de compostos químicos puros e mantém um banco de dados bastante completo e atualizado sobre a mutagenicidade de diferentes compostos.

3. Participação em Seminários

Durante o período de treinamento assistimos à dois seminários:

3.1. Efeito do ácido bórico na reprodução e fertilidade de roedores

Conferencista: Dra. Patricia Fail, pesquisadora do Center for Life Science and Toxicology do RTI.

Local: RTI, RTP

Data: 10/11/90

3.2 Fatores que influenciam o espectro mutacional do alelo hisD3052 de *S. typhimurium*.

Conferencista: Jessie Levine, MS, doutoranda do Dr. David DeMarini da EPA.

Local: EPA, RTP

Data: 06/12/90

4. Comentários e Conclusões

O treinamento realizado foi de grande importância tanto para o desenvolvimento do projeto PROCOP em andamento como para o enriquecimento dos nossos conhecimentos, tendo permitido a atualização da área em novas metodologias utilizadas na avaliação de compostos genotóxicos no meio ambiente e em aspectos de controle de qualidade e segurança em laboratórios de mutagênese.

Além disso proporcionou o intercâmbio entre órgãos do governo americano (EPA e NIEHS) e institutos de pesquisa de natureza privada (RTI e EHRT) com a CETESB, contactos esses que no futuro poderão ser muito úteis na obtenção de informações e recentes avanços em área com tão ampla aplicação no controle da poluição ambiental, como a Genética Toxicológica.

5. Resumo do Relatório

Este relatório descreve a viagem de treinamento de curta duração da Bióloga Gisela Umbuzeiro Valent, do Setor de Microbiologia da Divisão de Análises Microbiológicas ao Research Triangle Park na Carolina do Norte, EUA durante o período de 19 de Novembro à 16 de Dezembro de 1990. As instituições visitadas foram o Research Triangle Institute (RTI) e a Environmental Protection Agency (EPA). O assunto básico do treinamento foi a detecção de compostos genotóxicos em amostras de ar através de bioensaios microbianos. Os recursos foram fornecidos pelo Programa de Assistência Técnica - PROCOP, através do projeto nº 35.16.00.

6. Agradecimentos

Gostaríamos de deixar expressos nossos agradecimentos às:

- . Diretoria da CETESB e a coordenação do PROCOP na pessoa do Eng. Arlindo Phillipi Jr. e equipe.
- . Dra. Petra S. Sanchez, gerente da Divisão de Análises Microbiológicas (NAB) e à Maria Inês Z. Sato, gerente do Setor de Microbiologia (NABM).
- . Ao corpo técnico das instituições visitadas, EPA e RTI pelo apoio e assessoramento que possibilitaram o êxito do treinamento realizado.

São Paulo, 21 de Fevereiro de 1991.

Gisela Umbuzeiro Valent

PROCOP
PROGRAMA DE CONTROLE DE POLUIÇÃO
PROGRAMA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA

PROJETO

Avaliação da Genotoxicidade de Material Particulado de Ar em Áreas Industriais e Urbanas do Estado de São Paulo através de Bioensaios Microbianos - Integração com Programas de Controle de Poluição do Ar.

ÁREA

DIVISÃO DE MICROBIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE APOIO OPERACIONAL
DIRETORIA DE NORMAS E PADRÕES AMBIENTAIS

PROCOP

RELATÓRIO TÉCNICO DE VIAGEM

MARIA INÊS ZANOLI SATO

KISSIMMEE, FL/IRVINE, CA - USA.

1. OBJETIVOS

- . Obter informações técnicas e científicas e treinamento prático especializado em métodos de toxicologia molecular empregados na avaliação da atividade genotóxica de amostras atmosféricas.
- . Participação no 22nd Annual Scientific Meeting of the Environmental Mutagen Society com apresentação do Trabalho "Microbial assays in the screening of genotoxic air pollutants", desenvolvido na CETESB dentro do Programa de Assistência Técnica do PROCOP, com recursos do BIRD.

2. PARTICIPAÇÃO NO 22nd ANNUAL MEETING OF THE ENVIRONMENTAL MUTAGEN SOCIETY

Local: Kissimmee (Orlando), Flórida - USA.
Período: 06 a 11 de abril de 1991.
Chairman: Dr. Michael D. Waters
U.S. Environmental Protection Agency.

O encontro anual da "Environmental Mutagen Society" visa o intercâmbio de informações na área de mutagênese ambiental, trazendo o que há de mais novo em estudos e pesquisas nesta área.

Estiveram presentes, representantes dos grandes centros de pesquisas dos Estados Unidos, bem como dos mais diversos países, entre eles: Canadá, México, Inglaterra, França, Alemanha, África do Sul, Índia, China, Japão, Austrália e outros.

Durante o encontro foram realizados diferentes Workshops e Simpósios, sendo tratados os seguintes assuntos:

- WORKSHOP I - Novas Técnicas Moleculares na Análise de Genoma. Parte A. O papel da reação de cadeia polimerase (PCR) na análise molecular de mutações.
- WORKSHOP II - Micronúcleo como um index de dano citogenético: passado, presente e futuro.
- WORKSHOP III - Novas Técnicas Moleculares na Análise de Genoma. Parte B. Análise Molecular de lesões genômicas de larga escala.
- WORKSHOP IV - Métodos existentes e tecnologia emergente para monitorar mutação gênica "in vivo".

SIMPÓSIO I - Base genética da indução de câncer.

SIMPÓSIO II - Antimutagênese e anticarcinogênese.

SIMPÓSIO III - Recombinação: Mecanismos, detecção e significado.

SIMPÓSIO IV - Susceptibilidade genética para doença.

Foram apresentados e discutidos 291 trabalhos de pesquisa dentro dos seguintes temas:

Apresentação oral:

- . Mutagênese em procariotos
- . Monitoramento humano I
- . Métodos de genotoxicidade em mamíferos/resultados
- . Dano de DNA/Mecanismo de reparo
- . Mecanismos de mutação em células de mamíferos
- . Métodos citogenéticos
- . Ensaio em células germinativas de mamíferos
- . Genotoxicidade "in vivo"/transformação em células de mamíferos
- . Misturas complexas e interações
- . Monitoramento humano II
- . Citogenética em células de mamíferos/Mutagênese em drosophila
- . Mutagênese em células de mamíferos/Mecanismos

Poster

- . Mutagênese/Análise Molecular/Mecanismos.
- . Químicos de interesse especial.

- . Misturas complexas; interação química.
- . Relações entre estrutura e atividade/informações de mutagenicidade.
- . Citogenética "in vivo".
- . Mutagênese "in vivo" em células somática e germinativa.
- . Monitoramento humano.
- . Dano de DNA e reparo.
- . Procariotos
- . Eucariotos não mamíferos
- . Citogenética, genotoxicidade.
- . Mutagênese em células de mamíferos.

Os resultados parciais do trabalho que a CETESB, vem desenvolvendo dentro do Projeto PROCOP : "Avaliação da genotoxicidade de material particulado de ar em áreas industriais e urbanas do Estado de São Paulo, através de bioensaios microbianos - Integração com Programas de Controle da Poluição do Ar", foram por nós apresentados no Encontro, dentro da Sessão "Misturas Complexas, Interações Químicas", sob o Título: "Microbial Assay in the Screening of Genotoxic Air Pollutants".

A pesquisa foi desenvolvida pela equipe dos Laboratórios de Análises Microbiológicas (NAB) da NA/N, com colaboração da equipe da Divisão da Qualidade de Ar (NPQ). O trabalho foi muito bem aceito pela comunidade científica presente no Encontro, parabenizando-nos pelo nível e qualidade da pesquisa que a CETESB está realizando na área de genética molecular dentro do controle de poluição.

A participação no Evento foi de grande valia, pois tivemos a oportunidade de estar em contato com o que há de mais novo e atual na área de mutagênese ambiental e divulgar à nível internacional as atividades que a CETESB, vem desenvolvendo no monitoramento de substâncias mutagênicas em amostras

ambientais. Por outro lado, tivemos ainda a oportunidade de discutir os trabalhos que estamos desenvolvendo com cientistas de renome internacional na área de genética molecular, auxiliando-nos nas condutas de nossas pesquisas, sendo que os principais contatos mantidos foram:

- Dr. Bárbara S. Shane - Louisiana State University - Baton Rouge - LA 70803 (Phone: 504-388-4302).
- Dr. Bruce N. Ames - University of California - Berkeley - CA USA. (Fax: 415-643-7935)
- Dr. B.W. Glickman - York University - Ontário - Canadá (Phone: 416-736-5242).
- Dr. Errol Zeiger - NIEHS - Research Triangle Park, NC - USA. (Phone: 919-541-4482).
- Dr. Frederick J. de Serres - Research Triangle Institute (RTI) Research Triangle Park, NC - USA. (Fax: 919-541-6499).
- Dr. Göian Löfroth - Nordic School of Public Health, Goteborg - Sweden (Phone: 031-69-3935).
- Dr. Larry D. Claxton, Dr. David de Marini, Dr. Virgínia HouK - U.S. EPA - Research Triangle Park, NC - USA. (Fax: 919-541-0968).
- Dr. Michael D. Waters - U.S. EPA - Research Triangle Park, NC - USA. (Fax: 919-541-0694).
- Dr. Raymond W. Tennant - NIEHS - Research Triangle Park, NC - USA. (Fax: 919-541-1460).
- Dr. Thomas A. Cebula - Food & Drug Administration - Washington, D.C. (Phone: 202-472-3060).

- Dr. Thomas Hughes - Environmental Research Health and
Testing (EHRT) - RTP - NC - USA. (Phone: 919-544-1792).

3. INSTITUIÇÕES VISITADAS E ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

3.1. University of California, Irvine (UCI)

Program in Social Ecology
California, USA. 92717

Phone: (714) 856 5281

Fax: (714) 725 2056

Coordenador: Dr. Betty H. Olson

Período: 15/04/91 à 03/05/91

Pesquisadores contactados: Dr. Susan M. Bradford; Dr. Oladele A. Ogunseitan; Dr. Yu-Li Tsai

A Universidade da Califórnia, em Irvine (UCI) foi criada em 1965 e compreende um Campus de aproximadamente 1.500 acres. Em 25 anos apresentou um rápido crescimento e desenvolvimento acadêmico, tendo atualmente cerca de 16.100 estudantes e Programa de Graduação nas áreas de: Ciências Biológicas, Engenharia, Artes, Ciências Humanas, Informática e Computação, Administração, Medicina, Ciências Físicas, Ecologia Social e Ciências Sociais, oferecendo título em 92 áreas diferentes.

A UCI conta com uma excelente biblioteca com mais de 1,4 milhão de livros e 20.000 periódicos, totalmente computadorizada, inclusive com diferentes sistemas de dados para pesquisa bibliográfica, otimizando o tempo dedicado a esta atividade.

O nosso estágio na UCI, se concentrou principalmente no Setor de Genética Molecular do Program in Social Ecology, dirigido pela Dr^a. Betty H. Olson, PhD pela Universidade de Berkeley, em 1974. A linha de pesquisa do laboratório está dirigida para a interação entre microrganismos e compostos químicos lançados no ambiente e inclui estudos de bioremediação, ecologia genética e engenharia genética, de grande importância na degradação de poluentes ambientais.

- . Bioremediação - é o uso de microrganismos normalmente presentes no solo, água e ar para degradar substâncias potencialmente tóxicas lançadas no meio ambiente. O crescimento de microrganismos autóctones é promovido através do lançamento de nutrientes e modificações físico-químicas no ambiente (aeração, pH, temperatura), o que encoraja o desenvolvimento de todos microrganismos inclusive os capazes de degradar os poluentes ambientais. Neste processo pouco se faz para selecionar bactérias específicas ou estimular genes específicos responsáveis pela biodegradação dos contaminantes.
- . Ecologia genética - é um refinamento do processo de bioremediação, através da identificação específica dos genes que degradam os poluentes e estímulo de sua atividade. Amostras ambientais são testadas para ver que genes estão presentes nos microrganismos autóctones. Fatores ambientais são modificados - primeiro em laboratório e a seguir no campo - para determinar as condições ótimas para reprodução e expressão do gene.
- . Engenharia genética - cria novos microrganismos nos laboratórios através da manipulação de material genético: genes são introduzidos nos microrganismos que naturalmente não os contêm. Este processo é menos promissor para a bioremediação do que a ecologia genética, porque existe uma grande resistência pública e dificuldade de manter microrganismos criados em laboratório, viáveis sob condições de campo.

Tivemos a oportunidade de realizar e acompanhar uma série de técnicas básicas de suma importância para laboratórios de Toxicologia Molecular:

. Extração de plasmídios por lise alcalina

Esta técnica é de suma importância para obtenção de plasmídios pequenos (<100 Kbp) de bactérias presentes no meio ambiente, que possam estar associados com a degradação de poluentes, como por exemplo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, mercúrio, etc. O ensaio consiste em crescer a bactéria portadora do plasmídio em caldo L (Lúria Broth), separar as células por centrifugação e lisá-las com SDS e tris - NaOH (pH - 12,5). Os restos celulares são

separados por centrifugação e o DNA plasmidial é extraído com fenol-clorofórmio, isopropanol e etanol e o RNA é digerido pela RNase pancreática. A seguir é realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose com brometo de etídeo para visualização do plasmídio isolado.

Este plasmídio isolado é submetido a digestão por enzimas de restrição, para isolamento dos genes envolvidos na degradação do poluente desejado. Esses genes podem ser marcados com ^{32}P e utilizados como "probe" (sonda) na identificação de microrganismos portadores dos mesmos genes através da técnica de hibridização de colônias, ou utilizados para clonagem em bactérias que serão empregadas na degradação de determinados poluentes ambientais.

. **Marcação de segmentos de DNA com ^{32}P - Técnica de "Nick Translation"**

Nesta técnica trabalhamos com segmentos de DNA responsáveis pela degradação de PCB's (Cbpc) e Naphtaleno (Nah), que foram marcados com ^{32}P , para serem utilizados como sonda (probe) na detecção de bactérias que possuem a sequência de genes que codificam as enzimas para a degradação desses produtos. Cerca de $10\mu\text{L}$ ($7\mu\text{g}$) de DNA extraído e digerido, de forma a conter os genes Cbpc e Nah, é denaturado em banho maria por 5 minutos e imediatamente colocado em gelo. A seguir adiciona-se o sistema de "primers" (d ATP, d GTP - d TTP e $[\text{D} - ^{32}\text{P}]$ d CTP - $10\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$), tampão e fragmento Klenow (DNA Polimerase I - $3\text{ units}/\mu\text{L}$). Após incubação por 1 hora à 25°C a reação de ressíntese do DNA é parada com EDTA Na_2 1mM . A separação do DNA "Nick-Translated" do que não incorporou d NTPs é realizada pela coluna "Elutip".

. **Método para extração direta de DNA de amostras ambientais**

O isolamento de DNA bacteriano de ambientes naturais tem se tornado um instrumento útil através do qual se pode estudar a função ecológica de certos genes característicos que codificam importantes vias metabólicas, descobrir microrganismos engenheirados e determinar a diversidade de DNA bacteriano em ecossistemas microbianos. As bactérias presentes nas amostras ambientais são lisadas pela adição de lisozima, tampão de lise (SDS e Tris HCl) e processo de resfria-

mento e aquecimento. O lisado é extraído com dodecil sulfato de sódio e fenol clorofórmio. O DNA extraído e digerido é isolado em gel de agarose e hibridizado com os genes que se quer determinar na amostra através da técnica de Southern blot.

• **Método para extração direta de mRNA de amostras ambientais**

Para se determinar se os genes presentes no DNA isolado são funcionais no ambiente nativo, é necessário se detectar a expressão de seus produtos (mRNA ou enzimas) "in situ". Este método permite observar se os genes de interesse em cada pesquisa em particular, estão sendo transcritos. A lise celular, fixação do RNA, e hidrólise do DNA é realizada por agitação vigorosa em solução de guanidina tiocianato, contendo citrato de sódio, sarcosil 0,5% e 2-mercaptoetanol. O mRNA é extraído com fenol-clorofórmio e o RNA total é precipitado com isopropanol. O mRNA extraído é isolado em gel de agarose e hibridizado com probes dos genes de interesse na amostra, através da técnica de Northern blot.

• **Método para contagem de bactérias pela técnica de Epifluorescência**

A técnica de epifluorescência para contagem de bactérias em amostras ambientais tem sido amplamente divulgada nos últimos anos devido a sua rapidez e simplicidade. Volumes determinados da amostra são filtrados em membrana nucleopore (0,2 μm), posteriormente são coradas com acridine orange 2% por 5 minutos. As membranas são dispostas em lâminas, coloca-se uma gota de óleo de imersão e cobre-se com lâminula. A lâmina é observada em microscópio com luz UV em objetiva 100x com óleo de imersão. A ocular contendo micrometro permite a contagem e cálculo do número de bactérias por mL.

Durante a nossa permanência no laboratório de genética do Program in Social Ecology tivemos a oportunidade de acompanhar ensaios de PCR (polimerase chain reaction) para amplificação e detecção de 16S rDNA (DNA ribossômico) e discutir os trabalhos que o laboratório vem realizando a nível de biologia molecular em relação a biodegradação de mercúrio, naftalenos e PCB's. Mantive-

mos ainda contato com uma série de pesquisadores de outros departamentos:

Dr. Daniel B. Menzel

Director, Southern Occupational Health Center
Department of Community & Environmental Medicine
Fax: (714) 725-2070

O departamento do Dr. Menzel está envolvido em estudos sobre alterações bioquímicas em células doentes, através da utilização de microscopia eletrônica, acoplada à microcomputadores, que permite visualizar de forma tridimensional o que está acontecendo tanto na superfície como no interior da célula. São estudos de alta tecnologia que tem contribuído muito para a elucidação de algumas doenças, principalmente o câncer ocupacional.

Dr. Ronald C. Shank

Director Graduate Program Environmental Toxicology
Community & Environmental Medicine
Phone: (714) 856-5186

Dr. Shank está envolvido no Programa de Toxicologia Ambiental da Universidade da Carolina, onde a pesquisa está mais voltada para o estabelecimento das bases moleculares dos processos cancerígenos decorrentes da exposição à poluentes ambientais, e trará algumas contribuições importantes para a ECO 92 no Brasil, no próximo ano.

Dr. Terese M. Olson

Water Resources and Environmental
Engineering
Phone: (714) 856-7188

Dr. Olson está envolvida com os problemas de chuvas ácidas na Califórnia, que tem sido uma grande preocupação na área, bem como com as fontes de abastecimento de água e os problemas de intrusão de água salgada nos lençóis freáticos dessa região dos Estados Unidos.

Dr. E. Hoffmann

Department of Developmental and
Cell Biology

Durante o contato com Dr. Hoffmann discutimos a utilização do ensaio de germinação de pollen, desenvolvido em seu laboratório como um bioensaio simples e sensitivo para avaliar toxicidade de amostras de águas e ar.

3.2. University of California, Riverside (UCR)

Statewide Air Pollution Research Center
Department of Soil and Environmental Sciences
Riverside, California 92521
Fone: (714) 787-3502
Fax: (714) 787-5004

Contatos: Dr. Janet Arey e Dr. William Harger

Data da visita: 02/05/91

O Statewide Air Pollution Research Center, localizado na Universidade da Califórnia, Riverside, vem desenvolvendo uma série de trabalhos sobre a determinação de poluentes atmosféricos, principalmente nesta área de Los Angeles até Riverside, que é muito afetada principalmente pela poluição de veículos automotores. Dr. Pitts desta Instituição, atualmente aposentado, foi um dos primeiros pesquisadores a iniciar os estudos da atividade mutagênica de material particulado de ar através do Teste de Ames e contribuiu muito nas pesquisas neste setor. O laboratório de mutagenicidade atualmente sob a direção do Dr. William Harger, continua avaliando a qualidade do ar desta região através de bioensaios microbianos principalmente Teste de Ames. Os estudos estão mais voltados para avaliar a contribuição de Nitrocompostos na atividade mutagênica de material particulado bem como, os períodos diários de maior pico de mutagenicidade.

A Dr. Janet Arey, especialista em química atmosférica, está diretamente envolvida com as análises químicas de amostras de ar. Tem trabalhado principalmente com determinação das concentrações de nitrofluoranteno, nitropirenos, nitroarenos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em extrato or-

gênico de material particulado, verificando a contribuição desses compostos na atividade mutagênica dessas amostras.

Dr. Arey tem estudado também a formação de metil nitronaftalenos a partir da reação de 1 - e 2 - metilnaftaleno com radicais OH e N_2O_5 e sua ocorrência na atmosfera. Durante nossa visita ao Statewide Air Pollution Research Center, tivemos a oportunidade de apresentar e discutir, os nossos dados parciais obtidos no Projeto PROCOP. Nosso trabalho foi bastante elogiado, entretanto todos foram unânimes em relação à necessidade de completar os dados obtidos nos ensaios microbianos com as análises químicas, colocando inclusive o laboratório à nossa disposição.

O contato com o Statewide Air Pollution Research Center foi muito importante, pois tivemos um 'feed-back' bastante positivo do trabalho que estamos conduzindo com bioensaios microbianos para avaliação da atividade mutagênica de material particulado de ar, principalmente com relação à utilização desses ensaios como um instrumento auxiliar de grande valia no controle da qualidade do ar.

3.3. Orange County Water District

10500 Ellis Avenue
P.O. Box 8300
Fountain Valley, Ca 92 728-8300
Fone: (714) 962 2411
Fax: (714) 962 6957

Contato: Dr. Charles D. McGee
Laboratory Supervisor

Data: 30/04/91

Orange County, Sul da Califórnia, é uma das regiões urbanas mais dinâmicas dos Estados Unidos. Localizada numa região semi-árida conta com uma população de 19 milhões. As fontes naturais de água superficial são bastante escassas (Santa Ana River e seus tributários) e combinadas com a precipitação fornecem somente 25% da demanda total de água. Por outro lado, a área está

sobre um grande reservatório natural de água subterrânea, responsável por 65% de toda água usada no distrito.

Orange County Water District foi constituído em 1933, por uma ato da Legislação da Califórnia para proteger e administrar a distribuição dessa água subterrânea. Desde 1949, o distrito importa água principalmente do Rio Colorado (Arizona), através de um aquaduto construído em 1930, para repor a água removida do aquífero. A tendência do Estado do Arizona, entretanto é reduzir gradualmente a exportação de água do Rio Colorado, cujo custo de importação se elevou rapidamente nos últimos anos. Como torna-se cada vez mais difícil obter água doce em Orange County e a demanda de água está aumentando, é clara a necessidade de conservar e reciclar a água na região. Um grande problema ainda enfrentado na área é a intrusão de água do mar no lençol subterrâneo, para isso o distrito opera um sistema de barreira hidráulica onde utiliza principalmente águas residuárias recicladas e água de poço profundo.

Para a reciclagem de águas residuárias o distrito conta com uma planta chamada de Water Factory 21 que produz água de alta qualidade e que tivemos a oportunidade de conhecer. O projeto tem sido reconhecido por muitos como um protótipo de sistema a ser construído para produzir distribuição de água suplementar para os Estados Unidos, durante o século 21, daí a denominação "Water Factory 21".

O sistema fornece $56.775 \text{ m}^3/\text{d}$ de água residuária tratada através de processo de alta tecnologia que combinam: clarificação química, recarbonação, filtração, adsorção por carbono ativo, cloração e osmose reversa, resultando em água de qualidade potável. Esta água é combinada com a água proveniente de poços profundos, fornecendo 23 milhões de galões de água de injeção para a barreira hidráulica.

Visitamos, além de todas plantas de tratamento, os laboratórios de microbiologia e físico-química, onde tivemos também a oportunidade de apresentar os trabalhos que estamos realizando na CETESB. O Dr. McGee apresentou grande interesse nos nossos estudos de atividade mutagênica em amostras de águas superficiais e águas tratadas, uma vez que está pensando em iniciar a implantação de bioensaios de mutagenicidade em seu laboratório.

4. PARTICIPAÇÃO EM SEMINÁRIO

Durante o período de treinamento assistimos a um seminário e fomos convidados a apresentar o nosso trabalho em dois seminários.

- 4.1. **Assunto:** Técnicas de Biologia Molecular no estudo da degradação de poluentes ambientais

Conferencista: Dr. Yu-Li Tsai

Local: Program in Social Ecology - UCI, CA.

Data: 26/04/91

- 4.2. **Assunto:** A CETESB como Agência de Proteção Ambiental em São Paulo, Brasil e as atividades específicas do Laboratório de Microbiologia, com ênfase à área de mutagenicidade

Conferencista: Biom. Maria Inês Zanoli Sato

Local: Program in Social Ecology - UCI, CA.

Data: 24/04/91

- 4.3 **Assunto:** "Microbial assays in the screening of genotoxic air pollutants"

Conferencista: Biom. Maria Inês Zanoli Sato

Local: Orange County Water District - Fountain Valley, CA.

Data: 30/04/91

5. COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES

O treinamento realizado foi muito importante e proveitoso, pois possibilitou a aquisição de subsídios técnicos e científicos de aplicação direta no projeto PROCOP em andamento, e permitiu a atualização da área nos mais modernos métodos de genética toxicológica utilizados na avaliação de compostos genotóxicos e degradação de poluentes ambientais.

Do ponto de vista profissional, esta viagem contribuiu muito para o nosso aprimoramento técnico científico e permitiu ainda a divulgação e o reconhecimento de nosso trabalho à nível internacional.

Os contatos mantidos com as diferentes instituições visitadas (UCI, UCR e OCWR) estabeleceu ainda o início de uma série de intercâmbios de informações com a CETESB, de grande importância no controle da Poluição Ambiental.

6. RESUMO DO RELATÓRIO

Este relatório descreve a viagem de treinamento de curta duração da Biomédica Maria Inês Zanoli Sato, do Setor de Microbiologia da Divisão de Análises Microbiológicas à Universidade da Califórnia, Irvine (UCI) e Riverside (UCR) e participação do 22nd Annual Meeting of the Environmental Mutagen Society durante o período de 06 de abril à 05 de maio de 1991.

As instituições visitadas foram Program in Social Ecology (UCI) e Statewide Air Pollution Research Center (UCR). O assunto básico do treinamento foi métodos de genética toxicológica para avaliação da genotoxicidade e de gradação de poluentes ambientais. Durante o 22nd Annual Meeting of the Environmental Mutagen Society foi apresentado o trabalho "Microbial Assay in the Screening of Genotoxic Air Pollutants", que compilam os resultados parciais do Projeto PROCOP (35.16.00). Os recursos foram fornecidos pelo Programa de Assistência Técnica - PROCOP, através do projeto nº 35.16.00.

7. AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de deixar expressos os nossos agradecimentos à:

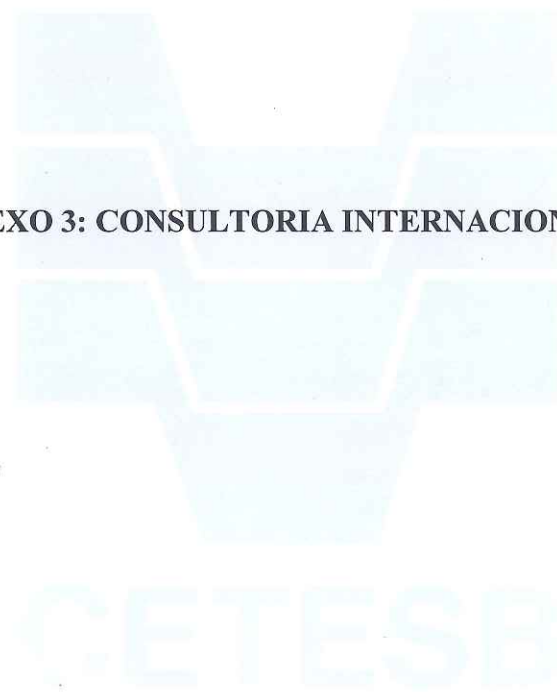
- . Diretoria da CETESB; a coordenação do PROCOP na pessoa do Eng. Arlindo Phillipi JR. e equipe; e a Dr^a. Petra S. Sanches, Gerente da Divisão de Análises Microbiológicas:

pelo esforço dedicado á viabilização desse treinamento.

- . Ao corpo técnico das instituições visitadas: Program in Social Ecology (UCI), Statewide Air Pollution Research Center (UCR), Orange County Water District:

pelo apoio e assessoramento técnico que possibilitaram que os objetivos de nosso treinamento fossem plenamente alcançados.

ANEXO 3: CONSULTORIA INTERNACIONAL



PROGRAMA DE TREINAMENTO - CONSULTORIA
TERMOS DE REFERÊNCIA

1. Consultor

Prof. Dr. **Larry Claxton**
Genetic Toxicology Division
Health Effect Research Laboratories
MD68, room H105
U.S. Environmental Protection Agency (EPA)
Research Triangle Park, NC 27711
USA

telefone: 919 541 2329

fax : 919 541 0968

2. Assunto

Controle de substâncias genotóxicas no meio ambiente através de bioensaios microbianos e controle de qualidade em laboratórios.

3. Objetivos

Esta consultoria tem por objetivo obter informações sobre os diferentes bioensaios empregados no monitoramento de substâncias genotóxicas no meio ambiente e discutir a aplicação e significado desses métodos em programas de monitoramento da qualidade do ar, incluindo informações sobre controle de qualidade em laboratórios de mutagênese ambiental.

4. Período

De 25 de Setembro a 01 de Outubro de 1993 (07 dias).

5. Local

Divisão de Análises Microbiológicas - NAB
Departamento de Apoio Operacional - NA
Diretoria de Normas e Padrões Ambientais - N
CETESB - Sao Paulo, SP, Brasil.

6. Relatório

O consultor deverá elaborar relatório ao final de suas atividades.

Gastos Previstos:

Diarias (15 x US\$ 53)	795
Passagem aérea (RDU/GRU/RDU)	2,505
SUB TOTAL	3,300
TOTAL (+ DECAF 1.42%)	4,680

SHORT TERM PROGRAM - CONSULTING WORKS
TERMS OF REFERENCE

1. Consultant

Prof. Dr. Larry Claxton
Genetic Toxicology Division
Health Effect Research Laboratories
MD68, room H105
U.S. Environmental Protection Agency (EPA)
Research Triangle Park, NC 27711
USA

telephone: 919 541 2329

fax : 919 541 0968

2. Consultancy title:

Control of genotoxic substances in the environment using
microbial bioassays and quality control.

3. Content

The aim of this consultancy is to provide informations about
the bioassays used in the control of genotoxic substances
in the environment, and to discuss the usefulness and meaning of
these methods in air quality monitoring programs, including
informations about quality control in environmental mutagenesis
laboratories.

4. Period

September, 25th to October, 1st of 1993 (07 days).

5. Place

Divisão de Análises Microbiológicas - NAB
Departamento de Apoio Operacional - NA
Diretoria de Normas e Padrões Ambientais - N
CETESB - Sao Paulo, SP, Brasil.

6. Report

The consultant should present brief report at the end of his activities.

102

File No.	5/2/97
Ref.	Memo 024/97
Initials:	ACD 20/1/97
Project:	PS
Date Taken	5/2/97



CETESB

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345 - Pinheiros

Fone: (011)210-1100 - Fax: (011)813-0227

Telex: 1183053 - CETS - BR - CEP 05489-900

São Paulo - SP - Brasil