

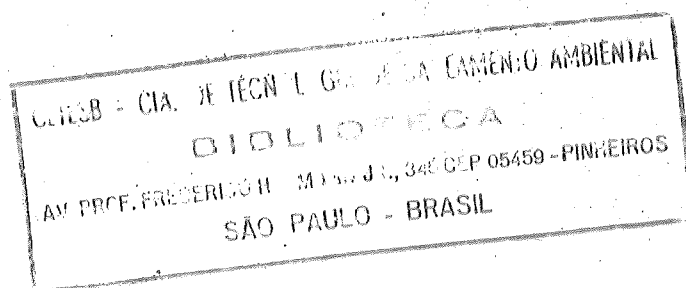
CETESB

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

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

CONVÊNIO SEMA/CETESB Nº 0106/87

Processo Nº 1324/87



AVALIAÇÃO DE TESTES RÁPIDOS DE MUTAGENICIDADE PARA CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE AR (MATERIAL PARTICULADO)

São Paulo - 1989

18497

CLASS.	8210
AU:	Ja 83a
TO:	18497

8210  
Sa83a (RCET)  
018497

**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO**

**Orestes Quércia**  
Governador

**SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE**

**Jorge Wilhelm**  
Secretário



**CETESB**

**Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental**

**DIRETORIA**

**Rogê Ferreira**  
Diretor-Presidente

**Eduardo San Martin**  
Diretor de Controle da Poluição

**Frederico Pegler Neto**  
Diretor Administrativo e Financeiro

**Jayne Gimenez**  
Diretor de Treinamento e Transferência de Tecnologia

**Laura Maria Regina Tetti**  
Diretora de Desenvolvimento de Programas e Mobilização

**Nelson Vieira de Vasconcelos**  
Diretor de Normas e Padrões Ambientais

CETESB

## FICHA TÉCNICA BIBLIOGRÁFICA

## DOCUMENTO

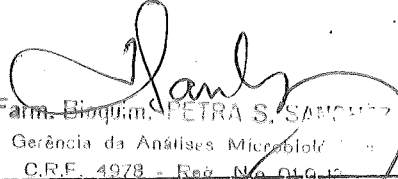
TIPO Relatório	DATA 31.03.89	ORIGEM NAB	Nº PÁGINA/V. 51 p	Nº MAPAS 0
-------------------	------------------	---------------	----------------------	---------------

## TÍTULO DO DOCUMENTO

Avaliação de testes rápidos de mutagenicidade para caracterização de amostras de ar (material particulado).

## AUTOR RESPONSÁVEL

ASSINATURA / CARIMBO / DATA

  
Farm. Bioquím. PETRA S. SANCHEZ  
Gerência de Análises Microbiol.  
C.R.F. 4978 - Reg. No. 01.01.10

## AUTORES/ENTIDADES OU UNIDADES A QUE PERTENCEM

NAB - Divisão de Análises Microbiológicas  
NABM - Setor de Microbiologia

DOCUMENTO AUTORIZADO POR

ASSINATURA / CARIMBO / DATA

## COORDENADOR DO PROJETO:

- Dra. Petra S. Sanchez (NAB)

DOCUMENTO REVISADO

ASSINATURA / CARIMBO / DATA

## EQUIPE TÉCNICA:

- Maria Inês Zanoli Sato (NABM)  
- Gisela Umbuzeiro Valent (NABM)  
- Maria Cristina L.S. Coelho (NABM)  
- Carlos Alberto Coimbra (NABM)

CLASSIFICAÇÃO DE SEGURANÇA

EXTERNA  INTERNA  
 RESERVADA

## PALAVRAS CHAVES

Mutagenicidade, teste de Ames, poluição do ar, material particulado, extração.

## CÓDIGO E TÍTULO DO PROJETO

Avaliação de testes rápidos de mutagenicidade para caracterização de amostras de ar (material particulado) O.S.: 875005  
Convênio SEMA/CETESB nº 106/87 - Processo nº 1324/87.

## DISTRIBUIÇÃO INTERNA

ÁREAS/Nº DE CÓPIAS SEMA - 02  
N - 01  
NA - 01  
TEDB - 01

## USO DA BIBLIOTECA

CLASSIFICAÇÃO DE ASSUNTO

8210 / 5083a

Nº DOCUMENTO

VISTO / CARIMBO / DATA

COORDENADOR DO PROJETO SEMA/CETESB Nº 0106/87

- Dr. Roque Monteleone Neto

COORDENADOR DO PROJETO:

- Dra. Petra S. Sanchez

Equipe Técnica

Maria Inês Zanoli Sato

Gisela Umbuzeiro Valent

Maria Cristina L.S. Coelho

Carlos Alberto Coimbra

## Í N D I C E

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
6. CONCLUSÕES.....	45
7. BIBLIOGRAFIA.....	46

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

	Pág.
TABELA 1. Comparação dos resultados obtidos para diferentes concentrações de material particulado de ar extraído pelo método de Soxhlet e ultrasonicação.....	23
TABELA 2. Concentrações de poluentes atmosféricos durante o período de coleta das 18 amostras de ar analisadas.....	25
TABELA 3. Atividade mutagênica dos extratos das 18 amostras de material particulado analisadas pelo Teste de Ames.....	35
TABELA 4. Efeito da ativação metabólica na atividade mutagênica das amostras de material particulado de Cubatão e São Paulo.....	39
TABELA 5. Resultados do Teste de Ames expressos em CME ( $\mu\text{g}/\text{placa}$ ) das 18 amostras de material particulado testadas.....	40
TABELA 6. Rank das amostras de extrato de material particulado com relação à atividade mutagênica (revertentes/ $\text{m}^3$ ) e à quantidade de material particulado de ar ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ).....	41
FIGURA 1. Número de revertentes por placa para diferentes concentrações de material particulado de ar extraído pelo método de Soxhlet (a.) e ultrasonicação (b.).....	24
FIGURA 2. Curva dose resposta obtida no Teste de Ames para as 18 amostras de material particulado analisadas - .....	26

- FIGURA 3. Atividade Mutagênica das 18 amostras de material particulado frente a cepa TA98 na ausência (a) e presença (b) de fração S9 expressa em revertentes/ $\mu$ g..... 37
- FIGURA 4. Atividade Mutagênica das 18 amostras de material particulado frente a CEPA TA100 na ausência (a) e presença (b) de fração S9 expressa em revertentes/ $\mu$ g..... 38
- FIGURA 5. Curva dose resposta da amostra-teste para a cepa S138 na presença e ausência de fração S9... 42
- FIGURA 6. Curva dose resposta dos extratos de material particulado frente as cepas S211 e S138 na presença e ausência de fração S9..... 43

## AVALIAÇÃO DE TESTES RÁPIDOS DE MUTAGENICIDADE PARA CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE AR (MATERIAL PARTICULADO)

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL  
BIBLIOTECA

### 1. INTRODUÇÃO

Recentemente a pesquisa de compostos mutagênicos em amostras ambientais vem adquirindo grande importância em consequência dos possíveis efeitos adversos à saúde da população que esses poluentes podem apresentar.

Desde os estudos de LEITER et alii (1942), que demonstraram que o alcatrão extraído de poeira atmosférica de algumas regiões dos Estados Unidos produzia sarcoma em ratos, e os estudos epidemiológicos de HITOSUGHI (1968), relacionando poluição de ar e incidência de câncer de pulmão, atenção especial vem sendo dada na detecção de compostos orgânicos na atmosfera.

Em decorrência da complexidade, custo elevado e longo tempo em preendidos nos bioensaios de carcinogenicidade, bem como da boa correlação que vem sendo observada entre mutagenicidade e carcinogenicidade (Mc CANN et alii., 1975; RINKUS & LEGATOR, 1980; TENNANT et alii., 1987), sistemas bacterianos tem sido propostos como método de triagem rápido e sensível para detecção de poluentes mutagênicos.

Frente aos sérios problemas que o Estado de São Paulo vem enfrentando com relação à poluição do ar, especialmente nos grandes centros urbanos e industriais, a implantação de metodologias rápidas e econômicas para a triagem de poluentes genotóxicos em material particulado de ar é de grande importância, podendo fornecer subsídios para futuros programas de monitoramento e auxiliar no estabelecimento de metas e critérios para uma política adequada de controle de poluição do ar.

## 2. OBJETIVOS

Implantar e avaliar metodologias analíticas rápidas para detecção de atividade mutagênica em amostras de ar (extrato de material particulado) visando fornecer subsídios para que os órgãos governamentais possam estabelecer metas para futuros programas de monitoramento da qualidade do ar.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As amostras atmosféricas podem conter tanto poluentes naturais (poeira, vegetação) como de origem antropogênica (emissões de veículos, fumaça, etc.); o que as torna de natureza muito complexa, podendo apresentar centenas de compostos diferentes na forma de gases e de material particulado (aerosol) (HUGHES et alii., 1980).

As partículas atmosféricas finas ( $< 10 \mu\text{m}$ ) são as que desempenham papel mais importante com relação ao efeito de saúde, pois penetram mais profundamente no sistema respiratório, atingindo inclusive os alvéolos pulmonares (CETESB, 1987). TALCOTT & HARGER (1980) analisando material particulado através do teste de Ames, demonstraram que 52 a 98% da atividade mutagênica estavam associadas às partículas menores que  $2 \mu\text{m}$ .

Segundo CHRISP & FISHER (1980), as amostras de material particulado tem demonstrado conter vários mutágenos diretos; porém, contém também grande quantidade de mutágenos indiretos tais como, o benzo [a] pireno e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, os quais necessitam de ativação metabólica para que possam apresentar atividade mutagênica. Portanto, é importante a utilização de enzimas microssomais de mamíferos para detecção desses compostos através de ensaios "in vitro", e o sistema mais comumente utilizado é o extrato microssomal de fígado de roedores após indução com bifenilas policloradas (PCBs).

Diferentes métodos de extração orgânica são utilizados no preparo de amostras de material particulado de ar antes de submetê-las aos testes de mutagenicidade, com o objetivo de recuperar os compostos orgânicos presentes na amostra. Dentre eles podemos citar o soxlet que foi empregado por: TOKIWA et alii (1977), para determinar a atividade mutagênica de poluentes atmosféricos em áreas industriais e residências no Japão; ALINK et alii (1983), para monitorar a mutagenicidade de material particulado em áreas não industriais; DAISEY et alii (1984), para estudar as influências re

gionais e locais na natureza do material orgânico de poluentes atmosféricos em New Jersey; LOUIS et alii (1987), para avaliar a mutagenicidade de material particulado inalável em New Jersey e outros, sendo sempre obtidos resultados satisfatórios em relação ao material orgânico extraído.

O método de ultrasonicação também tem sido empregado por alguns autores, com eficiência, na extração de poluentes mutagênicos de material particulado e podemos citar os estudos de: PITTS et alii (1982), para verificar as variações diurnas na mutagenicidade de material particulado na Costa Sul da Califórnia; VIAU et alii (1982), para comparar a eficiência de diversos solventes na extração de compostos genotóxicos de material particulado; AVERY et alii (1983), para determinar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes em material particulado de zonas urbanas; SASAKI et alii (1986), para avaliar a atividade mutagênica de material particulado em Tokio, além de outros. A ultrasonicação, precedida de agitação, foi utilizada por COURTOIS (1984), em estudo sobre a genotoxicidade de partículas atmosféricas em suspensão na zona urbana de Paris, fornecendo resultados satisfatórios.

Apesar da extração com soxhlet ser a mais frequentemente utilizada por diversos autores, estudos comparativos realizados por GOLDEN & SAWICKI em 1978 e KRISHNA et alii em 1983b, de monstraram ser a ultrasonicação o método mais eficiente para extração de mutágenos de amostras de material particulado.

Com relação ao solvente a ser empregado na extração de material particulado, existe um grande número de trabalhos na literatura que demonstram a eficiência de diferentes solventes na recuperação de compostos mutagênicos detectados através de bioensaios de mutagenicidade, especialmente no Teste de Ames. A escolha do solvente depende do tipo de composto que se pretende recuperar, não existindo um procedimento padrão.

TOKIWA et alii (1977), ALINK et alii (1983). e SEEMAYER (1985) uti

lizaram metanol em soxhlet. TAKEDA et alii (1984) comparando áreas industrial, rural e residencial do Japão utilizaram benzeno em soxhlet.

Outros autores empregaram mistura de solventes polares e apolares com o objetivo de extrair maior variedade de compostos mutagênicos. PITTS et alii (1982), estudando as variações diurnas de mutágenos presentes na atmosfera da Califórnia utilizaram a ultrasonicação com mistura 1:1:1 de metanol, tolueno e diclorometano. DAISEY et alii (1980) e LOUIS et alii (1987) analisando material particulado de Nova York e New Jersey respectivamente, empregaram solventes de diferentes polaridades: ciclohexano, diclorometano e acetona em soxhlet, separadamente. GROSJEAN (1975) também recomenda o uso de extração com dois solventes, um polar e um apolar, por ser um método mais eficiente em comparação com a extração somente com benzeno.

COURTOIS em 1984, estudando genotoxicidade das partículas atmosféricas da região central de Paris, utilizou o diclorometano e acetona por ultrasonicação. HUISINGH et alii (1980), estudaram o potencial mutagênico de extratos de emissões de combustão de veículos automotores e recomendam o uso do diclorometano como o melhor solvente.

DE RAAT (1983) avaliou material particulado em diferentes regiões da Holanda e os resultados de seus experimentos revelaram que, a extração com metanol é melhor ou no mínimo igual à extração com outros solventes, bem como que a combinação do metanol com outros solventes apolares não aumenta a recuperação de compostos genotóxicos.

KRISHNA et alii (1983a), em estudos de comparação entre solventes, mostraram que a melhor extração de compostos genotóxicos ocorreu com acetona seguida de diclorometano e também sugerem que a quantidade de solvente adequada para a máxima recuperação de material mutagênico deve ser 1 mL de acetona para cada miligrama

ma (MG) de material particulado

A detecção de compostos mutagênicos em extratos de material particulado de ar pode ser realizada através de métodos químicos e biológicos. Atualmente os testes "in vitro" usando microrganismos têm sido os mais utilizados devido sua praticidade e baixo custo, quando comparados com os testes "in vivo" com mamíferos ou análises cromatográficas e espectrométricas. Dentre os ensaios "in vitro" com microrganismos, o Teste de Ames (Salmonella/mammalian microsome mutagenicity assay) descrito por AMES et alii (1975) e revisado por MARON & AMES (1983), tem sido o ensaio mais conhecido e amplamente utilizado para análise de amostras ambientais.

O uso do Teste de Ames na triagem de carcinógenos é baseado no princípio que o câncer pode ser iniciado por uma alteração no DNA (mutação), e que agentes que causam dano ao DNA das linhagens bacterianas usadas no ensaio, podem também causar dano ao DNA de células de mamíferos; portanto compostos químicos puros ou misturas complexas que causam mutações nessas bactérias podem constituir risco à saúde humana (AULETA & ASHBY, 1988).

O Teste de Ames pode fornecer uma medida mais direta da atividade genotóxica de aerossóis urbanos do que uma simples medida da massa de material particulado ou de material orgânico extraído. HUGHES et alii, publicaram em 1980 uma revisão sobre o uso do Teste de Ames na avaliação de atividade mutagênica de aerossóis e recomendam a utilização deste ensaio ao se iniciar pesquisas em mutagenicidade de extratos de material particulado. Alguns trabalhos dessa revisão demonstram que o material orgânico extraído de áreas urbanas é mais mutagênico do que o de áreas não urbanas (TOKIWA et alii, 1977; PITTS et alii, 1977; ALFHEIM & MOELLER, 1979). Em adição, nenhuma atividade mutagênica foi encontrada em amostras coletadas de zonas rurais (PITTS et alii, 1977; ALFHEIM & MOELLER, 1979). Estes dados sugerem que a mutagenicidade relativa do material orgânico presente nas partículas atmosféricas, pode ser um indicador relevante do risco à saúde

humana, associado com a exposição a esse material particulado.

McGEORGE et alii (1985) e NEAL et alii (1981) utilizaram também o Teste de Ames com sucesso na análise de efluentes industriais de várias categorias. LOPER (1980), mostrou a utilidade do Teste de Ames na análise de água tratada e sua importância no acompanhamento dos processos de tratamento.

Com relação à compostos químicos puros, segundo o Environmental Mutagen Information Index (EMIC) - USA, em 1983 mais de 5000 compostos já tinham sido analisados frente ao Teste de Ames (MARON & AMES, 1983). Mais recentemente, DUNKEL et alii (1985) e MORTELMANS et alii (1986) publicaram os dados relativos aos resultados do Teste de Ames para mais um grande número de compostos químicos.

Estudos sobre a correlação entre mutágenos detectados pelos testes "in vitro" e compostos cancerígenos têm apresentado resultados diversos. Mc CANN et alii (1975) observaram 90% de correlação entre respostas positivas no Teste de Ames e carcinógenos conhecidos. Outros autores reportaram 91% (PURCHASE et alii, 1978); 77% (RINKUS & LEGATOR, 1980) e 60% (TENNANT et alii, 1987).

O Teste de Ames utiliza várias linhagens de Salmonella typhimurium especialmente modificadas, capazes de detectar agentes que causam mutações gênicas no DNA por deslocamento do quadro de leitura (frameshift) tais como a TA1537, TA1538, TA97a ou por substituição de pares de bases (base pair substitution) no DNA, como a TA1535, TA100 e TA102.

Com relação ao uso das diferentes cepas do Teste de Ames, TOKIWA et alii (1977), estudando poluentes mutagênicos de amostras de ar, testaram 6 cepas, e concluíram que a cepa mais sensível foi a TA98, seguida da TA1538. DAISEY & LEIKO (1979), analisando aerosol da cidade de Nova York, mostraram que das 5 cepas estudadas, as mais sensíveis foram a TA98 e TA100, HUGHES et alii (1980) recomendam o uso da TA98 seguida da TA100 para análise de material particulado de ar. TALCOTT & HARGER (1980), em experimentos ini

ciais, concluíram que a cepa TA98 demonstrou maior sensibilidade na detecção de mutágenos presentes em amostras de ar. COURTOIS (1984) analisando extratos de material particulado de ar do centro de Paris, estudou a resposta de várias cepas do Teste de Ames e a mais sensível foi a TA98.

Outro ensaio com microrganismos que tem sido utilizado para a detecção de atividade mutagênica de amostras ambientais é o Teste de Mutação Reversa em Saccharomyces cerevisiae descrito por BRUSICK & MAYER (1973) e que foi utilizado por NEAL et alii (1981) e SANCHEZ et alii (1988) na análise de amostras ambientais líquidas tais como efluentes industriais e corpos d'água receptores.

O teste utiliza cepas haplóides de S. cerevisiae auxotróficas para metionina, que detectam mutágenos que causam tanto deslocamento do quadro de leitura (S138) como troca de pares de bases (S211). De MARINE (1979) utilizando outras cepas haplóides auxotróficas de S. cerevisiae obteve resultados positivos ao testar condensado de fumaça de cigarro e suas frações orgânicas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Amostragem

Um total de 19 amostras de material particulado de ar (partículas totais em suspensão) da cidade de São Paulo e Cubatão, foram extraídas e analisadas quanto ao seu potencial mutagênico. A coleta foi feita em filtros de fibra de vidro Gelman A/E e amostradores de ar HI-VOL por um período de 24 horas e uma vazão média de 2000 m<sup>3</sup> de ar. Os filtros foram pesados antes e depois da amostragem após equilíbrio à 45% de umidade. Os filtros amostrados foram armazenados entre papel de alumínio e em envelopes de papel Kraft à temperatura ambiente.

### 4.2. Preparo da Amostra

A aplicação de testes de mutagenicidade em amostras de material particulado de ar requer uma etapa prévia que inclui técnicas de extração orgânica e concentração, com a finalidade de retirar o material orgânico presente na amostra e obter uma amostra suficientemente concentrada para ser submetida aos testes de mutagenicidade. Os métodos selecionados foram a ultrasonicação e o soxhlet, tendo sido a primeira, a técnica escolhida para a realização deste estudo, porém uma das amostras foi dividida e preparada utilizando-se o soxhlet e a ultrasonicação para um estudo comparativo.

#### 4.2.1. Extração por Ultrasonicação

O método se baseia nos descritos por PITTS et alii (1982) e por COURTOIS (1984). Metade de cada filtro amostrado foi ultrasonicado por 10 min. submerso em 100 mL de mistura de solventes (metanol e diclorometano 1:1). O extrato foi retirado e a

amostra foi submetida a novo processo de extração nas mesmas condições. Os extratos obtidos foram combinados e filtrados em membrana de fibra de vidro AP20 (Millipore) utilizando-se funil de filtração de vidro. O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório à vácuo à 45°C e seco completamente em fluxo de nitrogênio gasoso à temperatura ambiente.

Após pesagem para avaliação do material orgânico extraído (MOE), os extratos foram ressuspensos em volumes adequados de Dimetilsulfoxido (DMSO) e armazenados no congelador à -20°C até o procedimento das análises.

Controles negativos foram realizados paralelamente ao ensaio, extraíndo-se filtros não amostrados e o cálculo do material orgânico extraído (MOE) foi feito diminuindo-se o valor obtido para o controle negativo do valor obtido para a amostra, e expresso em µg de material orgânico extraído por m<sup>3</sup> de ar.

#### 4.2.2. Extração por Soxhlet

O método utilizado foi adaptado do descrito por DAISEY & KNEIP, (1982). Um quarto de um filtro amostrado foi colocado em um Soxhlet contendo 150 mL de diclorometano. Após 4 horas, o extrato foi retirado do aparelho e a amostra extraída sequencialmente com 150 mL de metanol por mais 4 horas.

Os extratos foram combinados, concentrados em evaporador à vácuo à 45°C e secos completamente em fluxo de nitrogênio gasoso. O material extraído foi ressuspensado em 4 mL de dimetilsulfóxido e

armazenado à  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização do ensaio.

#### 4.3. Procedimento das Análises

##### a) Teste de Ames (Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Assay).

O Teste de Ames foi realizado através do método de incorporação em placa segundo MARON & AMES (1983). Este ensaio utiliza cepas de S. typhimurium auxotróficas para histidina que tem a capacidade de detectar mutágenos que causam mutações de ponto. As cepas mutantes empregadas neste estudo foram a TA98 e TA100 que detectam respectivamente mutação por deslocamento do quadro de leitura do DNA e mutação por substituição de pares de bases. Durante toda a execução das análises as cepas foram testadas quanto às suas características genéticas e taxa de reversão espontânea. Os experimentos foram conduzidos com e sem ativação metabólica, utilizando-se microsomo de célula de fígado de rato induzido com Aroclor 1254 - Fração S9 (Hazleton- Organon-USA).

Controles positivos utilizando-se acetilaminofluoreno (10  $\mu\text{g}$ /placa) para TA 98 com S9 e azida sódica ( 5  $\mu\text{g}$ /placa) para TA100 foram conduzidos paralelamente às análises das amostras. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Foram testadas de 4 a 5 doses do extrato por cepa, sendo 200  $\mu\text{L}$  o volume máximo de amostra testado por placa. Quando a quantidade de material extraído foi inferior à necessária para se empregar as duas cepas, utilizou-se o critério recomendado por HUGHES et alii (1980), dando-se preferência para TA98 + S9, seguida de TA98 - S9, TA100 + S9 e finalmente TA100 - S9.

A máxima dose aplicada por placa foi de 1000  $\mu\text{g}$ , ou 750  $\mu\text{g}$  seguida de 500, 250, 100, 50 e 10  $\mu\text{g}$ . A estratégia de exposição foi sendo modificada em função da evolução das análises. As placas foram incubadas à 35°C por 48 horas e a seguir procedeu-se a contagem do número de colônias revertentes. O número de revertentes induzidos é função da concentração e da potência dos agentes mutagênicos presentes nas amostras.

Os resultados foram expressos através de curva dose-resposta, plotando-se na abcissa as doses testadas e na ordenada o número de revertentes por placa e, através da razão de mutagenicidade (RM) que é a razão entre o número de colônias revertentes na placa teste (revertentes espontâneas e induzidas) e o número de colônias revertentes na placa controle.

A partir da reta de regressão linear obtida da curva dose resposta derivou-se a concentração mínima efetiva (CME), que é a maior concentração capaz de induzir uma resposta positiva para cada cepa testada, e pode-se calcular o número de revertentes por  $\mu\text{g}$  de extrato. O CME foi expresso tanto em  $\mu\text{g}$  de material orgânico extraído como em  $\text{m}^3$  de ar equivalente por placa.

Considerou-se uma amostra positiva quando a razão de mutagenicidade foi igual ou superior à 2,0 e foi observado uma correlação linear significativa pelo menos em 3 das doses testadas. Quando somente um dos critérios foi atingido considerou-se que a amostra apresentou um resultado marginal (indícios de mutagenicidade). Esse critério de interpretação de resultados foi baseado naquele adotado por Mc GEORGE et. alii (1985).

De acordo com os valores de CME em  $\mu\text{g}$  de extrato, calculados para cada cepa, pode-se avaliar a atividade mutagênica das amostras como alta (A); moderada (M), baixa (B) e não detectável (ND) conforme descrito pela EPA (1980).

b) Ensaio de mutação reversa utilizando-se Saccharomyces cerevisiae S138 e S211.

Este sistema utiliza duas linhagens de S.cerevisiae S138 que detecta mutações tipo framashift e S211 que detecta mutações por substituição de pares de bases no DNA. As mutações reversas nessas linhagens são medidas através da sua capacidade de crescer na ausência do aminoácido metionina.

O teste foi realizado segundo metodologia recomendada por BRUSICK & MAYER (1973). As linhagens de S. cerevisiae S138 e S211 são derivadas da linhagem haplóide S288c gentilmente fornecidas pelo Dr. R. Jagannath da Hazleton Biotechnology Corporation, Maryland, USA o obtida originalmente do Dr. R. K. Mortimer, da Universidade da Califórnia, Berkeley, USA.

Os experimentos foram efetuados com pré incubação na presença e ausência de ativação metabólica, utilizando-se microssomo de células de fígado de rato induzido com Aroclor 1254 - fração S9 (Hazleton-Organon, USA). Os testes foram realizados incluindo-se controles negativos e positivos. Os controles positivos utilizados foram 30  $\mu\text{g}$  de Quina crine mostarda por tubo para S138 e 10  $\mu\text{L}$  Etilmetanosulfonato por tubo para S211. Testes de toxicidade foram realizados paralelamente à análise das amostras. Periodicamente as cepas de

S. cerevisiae foram testadas para confirmação da sua auxotrofia e taxa de reversão normal.

As doses aplicadas foram 1000, 500 e 200  $\mu\text{g}$  de material orgânico extraído (MOE) por tubo de pré incubação em um volume máximo de 200  $\mu\text{L}$ . Para a determinação do número de colônias revertentes utilizou-se 8 placas de meio mínimo por amostra e 3 placas de meio completo para avaliação das colônias sobreviventes após diluição adequada. As placas foram incubadas à 30°C por 13 dias para contagem do número de colônias revertentes e 3 dias para as colônias sobreviventes.

Os resultados foram expressos através de uma curva dose resposta plotando-se na abcissa as doses testadas e na ordenada o número de revertentes/placa; e através da razão de mutagenicidade (RM), que é a razão entre o número de colônias revertentes na placa teste (revertentes espontâneas e induzidas) e o número de colônias revertentes na placa controle (revertentes espontâneas).

Razões de mutagenicidade maiores ou iguais a 2,0 e correlação linear significativa entre as três doses testadas e o número de revertentes/placa foram indicativos de presença de atividade mutagênica na amostra.

#### 4.4. Análises Físico-químicas

As análises de dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ), óxidos de nitrogênio ( $\text{NO}_2$  e  $\text{NO}_x$ ), monóxido de carbono (CO) e ozona ( $\text{O}_3$ ) foram realizadas pela Divisão de Telemetria (DTE) e as análises de material particulado (MP) e carbono total

(TC) pela Divisão de Amostragem e Análise do Ar (DAMAR). Os métodos de análise empregados foram os recomendados pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1976).

#### 4.5. Análises Estatísticas

Com os dados obtidos nos testes de mutagenicidade foi realizada uma análise de regressão da porção linear de cada curva dose-resposta. O estabelecimento da regressão linear foi precedido de uma análise de variância (teste de F) segundo ACTON (1959). Na análise dos dados do Teste de Ames, quando ocorreu a perda de uma repetição, o valor foi substituído pela média das outras duas repetições (somente para efeito dos cálculos da análise de variância).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Métodos de Extração Orgânica

Foram avaliados dois métodos de extração num ensaio preliminar, o soxhlet e a ultrasonicação, conforme descrito em material e métodos. Neste ensaio não foi possível avaliar o peso do material orgânico extraído (MOE) pois o método de extração estava em implantação; assim, a avaliação foi feita com relação à resposta do extrato frente as cepas TA98(+ S9) e TA100(- S9) e o material testado foi expresso em m<sup>3</sup>/placa. Os resultados deste ensaio estão na Tabela 1 e Figura 1.

Ambos os extratos foram positivos para a cepa TA98 com S9, porém quando o método de ultrasonicação foi utilizado a concentração mínima (CME) foi a metade do valor obtido quando o soxhlet foi empregado. Além disso, o extrato obtido por ultrasonicação apresentou um resultado marginal para a cepa TA100 - S9, e o extrato obtido por soxhlet apresentou resultado negativo para a mesma cepa, sugerindo a maior eficiência da extração de compostos mutagênicos de material particulado de ar pelo método de ultrasonicação. Os resultados concordam com os dados obtidos por GOLDEN & SAWICKI (1978) e KRISHNA et alii (1983a) que demonstram a superioridade do método de ultrasonicação na extração de mutágenos presentes em amostras de material particulado.

### 5.2. Análises Físico-químicas

Os resultados das análises físico-químicas realizadas paralelamente a coleta das 18 amostras de material particulado de ar de São Paulo e Cubatão estão resumidos na Tabela 2. Esta tabela contém também os dados de material particulado (partículas totais em suspensão) avaliado conforme item 4.4 e material orgânico extraído pelo método descrito no item 4.2.1.

Todas as amostras não excederam o padrão nacional de qualidade do ar para 24 horas exceto as de número 4, 7, 10 e 16 que apresentaram valores acima do padrão com relação à material particulado (CETESB, 1987).

Os valores obtidos para material particulado (MP) e material orgânico extraído (MOE), foram submetidos à análise de regressão, e obteve-se um coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0.725955, significativo a nível de 0,1% ( $n=18$ ), sugerindo que tanto maior a quantidade de material particulado, maior a quantidade de material orgânico extraído nas amostras analisadas.

### 5.3. Testes de Mutagenicidade

#### 5.3.1. Teste de Ames

Os resultados da atividade mutagênica dos extratos das 18 amostras de material particulado obtidos através do Teste de Ames estão apresentados na Figura 2 através de curvas dose-resposta obtidas para cada amostra.

Os dados obtidos no Teste de Ames foram submetidos à uma análise de variância (Teste de F), e em todos os ensaios foi observada uma diferença significativa entre as doses testadas, já sugerindo a positividade das amostras. Entre as repetições (triplicata), não foi observado em nenhum ensaio, diferenças significativas, permitindo que os dados individuais fossem utilizados no estabelecimento da regressão linear da curva dose resposta obtida em cada ensaio.

A Tabela 3 apresenta um resumo dos resultados individuais, contendo a equação da reta de regressão linear, o coeficiente de correlação e a classificação da amostra. Os 18 extratos apresentaram atividade mutagênica em pelo menos uma das cepas testadas. A atividade mutagênica foi expressa em revertentes por  $\mu\text{g}$  de extrato, sendo que este valor corresponde ao coeficiente de  $x$  da reta de regressão linear e quanto maior esse valor mais mutagênica é a amostra. Os coeficientes de correlação obtidos foram elevados, com um significado estatístico de 0,1% em quase todas as amostras. As amostras números 2, 6 e 12 embora apresentassem efeito dose-resposta, tiveram uma razão de mutagenicidade inferior a 2 frente a cepa TA100 sem S9, e a amostra número 7 se comportou de maneira inversa. Esses resultados foram considerados como indícios de mutagenicidade (resultado marginal).

Os valores de revertentes por  $\mu\text{g}$  de extrato testado para as cepas TA98 e TA100 (na presença e ausência de ativação metabólica) estão também apresentados na forma de histograma nas Figuras 3 e 4 respectivamente. Os resultados indicam a presença de mutágenos tanto que causam substituição de pares de bases no DNA como que causam deslocamento do quadro de leitura (frameshift). Apesar da cepa TA98, que detecta preferencialmente mutágenos do tipo "frameshift" ser reconhecida como a mais sensível na detecção de mutágenos presentes em amostras de material particulado de ar

(HUGHES et alii, 1980; TALCOTT & HARGER, 1980; COURTOIS, 1984), os resultados obtidos sugerem que ambas as cepas são importantes em um teste de triagem de compostos mutagênicos em material particulado de ar.

O efeito da ativação metabólica nos extratos estudados foi quantificado determinando-se a porcentagem de aumento da atividade mutagênica na presença e ausência da fração S9 e os resultados das análises são mostrados na Tabela 4. A ativação metabólica aumentou o nível de atividade mutagênica das amostras em uma média de 63%. Quando consideramos a origem das amostras, verificamos que este aumento foi mais significativo para as amostras procedentes de São Paulo (90%) do que as de Cubatão (13%), o que era esperado, uma vez que a poluição em São Paulo, está mais vinculada a emissão da combustão de veículos automotores, sabidamente mutagênico na presença de fração S9. Das duas cepas, o maior efeito foi observado com a TA100 nos extratos de material particulado de S.Paulo. Dados similares foram relatados por ATHERHOLT et alii (1985) em estudos de mutagenicidade de extratos de material particulado de New Jersey, USA. Esses resultados reforçam a importância do uso de ativação metabólica (fração S9) nos ensaios de mutagenicidade, já enfatizado no trabalho CHRISP & FISHER (1980) sobre mutagenicidade em material particulado.

Como já mencionado, os resultados também foram expressos através da concentração mínima efetiva do extrato capaz de induzir resposta positiva no Teste de Ames (CME) e a Tabela 5 apresenta de forma resumida os valores da CME em  $\mu\text{g/placa}$  para as 18 amostras de extrato de material particulado testa

das. De acordo com o valor de CME ( $\mu\text{g}/\text{placa}$ ), pode-se classificar as amostras em altamente mutagênicas, quando apresentam CME menores que  $50 \mu\text{g}$ ; em moderadamente mutagênicas quando apresentam CME entre  $50 - 500 \mu\text{g}$  e com baixa atividade mutagênica para valores de CME entre  $500$  e  $5000 \mu\text{g}$ . Acima de  $5000 \mu\text{g}$  considera-se que a amostra apresenta atividade mutagênica não detectável (EPA, 1980).

Considerando-se essa classificação, das 14 amostras testadas frente a cepa TA98 na ausência de S9, 36% apresentaram alta atividade mutagênica e 57% atividade moderada. Das 18 amostras avaliadas para a TA98 na presença de S9, 67% apresentaram alta atividade mutagênica e 33% atividade moderada.

Com relação a cepa TA100, na ausência de S9, das 11 amostras testadas 63% apresentaram atividade mutagênica moderada, 9% baixa atividade e 28% apresentaram resultado marginal. Na presença de S9 todas as 12 amostras apresentaram atividade mutagênica moderada.

Visando correlacionar a atividade mutagênica dos extratos, obtida no Teste de Ames com a quantidade de material particulado presente na amostra os valores de revertentes/ $\text{m}^3$  para a cepa TA98 com S9 e da massa de material particulado coletado (MP), foram ordenados de forma crescente, de acordo com a magnitude da resposta obtida (Tabela 6). Assim podemos verificar que as amostras de números 4, 7, 10

e 16, as quais não atenderam os padrões nacionais de qualidade do ar foram classificadas respectivamente nos ranks 2, 8, 12 e 3 de atividade mutagênica. A amostra número 3 que foi a de maior potencial mutagênico, apresentou valor baixo de material particulado (rank 7). As amostras 13 e 14, apresentaram tanto valores baixos de mutagenicidade como de material particulado (MP). A análise de regressão feita com os valores de revertentes/m<sup>3</sup> e revertentes/μg para a cepa TA98 +S9 e a quantidade de material particulado (MP), mostraram a não existência de correlação entre estes dados ( $r = 0,406761$ , N.S. ;  $r = 0,047126$ , N.S., respectivamente). Esses resultados demonstraram que amostras com baixos valores de material particulado, atendendo os padrões nacionais de qualidade do ar podem apresentar alta atividade mutagênica, reforçando a importância dos ensaios de mutagenicidade na avaliação da qualidade do ar.

#### 5.3.2. Teste de Reversão Gênica utilizando-se Saccharomyces cerevisiae S211 e /138.

Os resultados relativos ao ensaio de reversão gênica utilizando Saccharomyces cerevisiae são apresentadas nas Figuras 5 e 6. O primeiro ensaio com S. cerevisiae, foi realizado com o extrato de uma amostra-teste, frente a cepa S138 na presença e ausência de S-9. Nesse experimento não foi possível avaliar o material orgânico extraído (MOE) pois o método de extração estava em implantação, sendo as doses testadas portanto expressas em m<sup>3</sup> de ar/placa (Figura 5). As outras quatro amostras (números 4, 7, 9 e 16) foram analisadas frente as cepas S211 e S138, na presença e ausência de S9.

As doses foram expressas em  $\mu\text{g}$  de material orgânico extraído (MOE) e  $\text{m}^3$  de ar, sendo que a dose máxima testada foi de 1000  $\mu\text{g}$  de extrato/placa. Não foi possível analisar um número maior de amostras do Teste com S. cerevisiae por insuficiência de quantidade do extrato.

Não foi observada presença de atividade mutagênica em nenhuma das amostras testadas. Para a realização deste ensaio de reversão gênica, seria conveniente utilizar doses mais elevadas. Porém isto não foi possível devido à limitação da quantidade de material orgânico disponível para teste. Comparando esses dados com os obtidos no teste de Ames, o teste com S. cerevisiae se mostrou menos sensível, só podendo ser aplicado em casos especiais, quando se dispõe de maior quantidade de extrato.

TABELA 1. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MATERIAL PARTI-  
CULADO DE AR EXTRAÍDO PELO MÉTODO DE SOXLET E ULTRASONICAÇÃO.

MÉTODO	CEPA	DOSE <sup>a</sup>	RM <sup>b</sup>	RETA REGRESSÃO	N <sup>c</sup>	r <sup>d</sup>	CME(m <sup>3</sup> ) <sup>e</sup>	CLASSIFICAÇÃO <sup>f</sup>
SOXHLET		0	-					
	TA98 + S9	0,33	0,96					
		3,26	1,92	y = 3,60x + 66,61	9	0,961772	3,16	+
		16,30	3,37			***		
	32,60	4,65						
ULTRASONICAÇÃO		0	-					
	TA100 - S9	0,33	0,92					
		3,26	0,96		12	0,991701	-	-
		16,30	1,25			n.s.		
	32,60	1,06						
ULTRASONICAÇÃO		0	-					
	TA98 + S9	0,26	1,00					
		2,60	2,43	y = 8,33x + 65,72	12	0,935937	1,55	+
		13,00	5,48			***		
	26,00	6,64						
ULTRASONICAÇÃO		0	-					
	TA100 - S9	0,26	0,83					
		2,60	0,95	y = 2,28x + 138,97	12	0,783668	-	+/-
		13,00	1,25			**		
	26,00	1,22						

a - m<sup>3</sup>/placa = metro cúbico por placa

b - RM = razão de mutagenicidade

c - N = número de ensaios

d - r = coeficiente de correlação; n.s. = não significativo

\*\*\* = P < 0,01; \*\* = P < 0,001

e - CME (m<sup>3</sup>) = concentração mínima efetiva em m<sup>3</sup>

f - + = resultado positivo

+/- = resultado marginal

- = resultado negativo

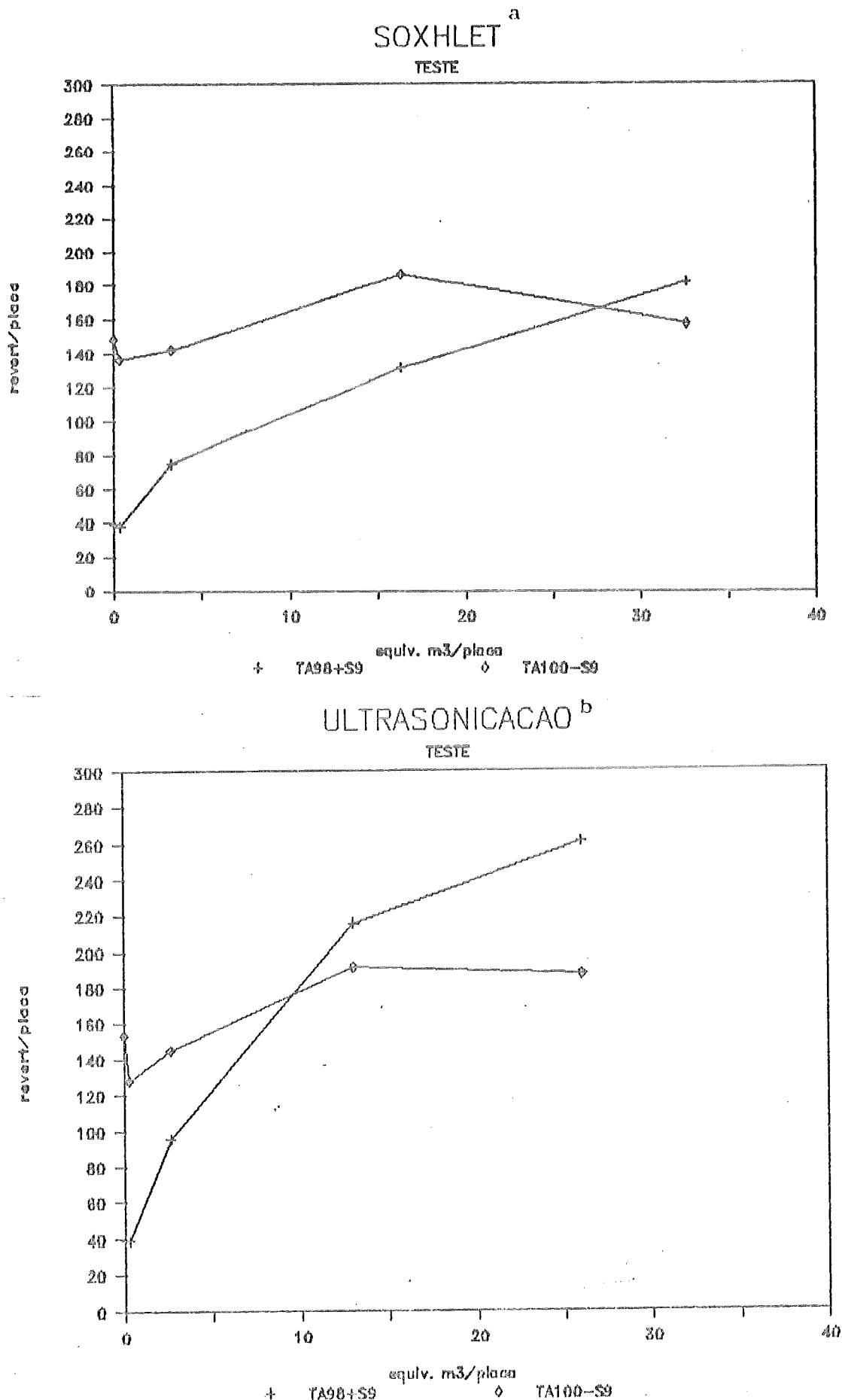


FIGURA 1. NÚMERO DE REVERTENTES POR PLACA PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MATERIAL PARTICULADO DE AR EXTRAÍDO PELO MÉTODO DE SOXHLET (a.) E ULTRASONICACÃO (b.)

TABELA 2. CONCENTRAÇÕES DE POLUENTES ATMOSFÉRICOS DURANTE O PERÍODO DE COLETA DAS 18 AMOSTRAS DE AR ANALISADAS.

AMOSTRA	DATA	SO <sub>2</sub> µg/m <sup>3</sup> (24 h)	NO <sub>2</sub> µg/m <sup>3</sup> (24 h)	NO <sub>x</sub> µg/m <sup>3</sup> (24 h)	CO p.m. (8-h) máx. diária	O <sub>3</sub> p.m. (1 h) máx. diária	TC <sup>b</sup> µg/m <sup>3</sup>	MP <sup>c</sup> (µg/m <sup>3</sup> )	MOE <sup>d</sup> µg/m <sup>3</sup>
1	10/05/87	26	47	89	1,6	0,024	-	72	27
2	16/05/87	31	53	118	2,8	0,015	45,8	108	22
3	09/07/87	45	92	263	4,1	0,024	67,3	153	45
4	27/07/87	89	137	432	5,6	0,080	113,8	319*	55
5	01/09/87	37	0	121	2,7	0,013	49,3	137	28
6	13/09/87	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	23,5	74	21
7	10/05/87	58	-	-	-	-	-	283*	47
8	16/05/87	71	-	-	-	-	-	137	9
9	09/07/87	68	-	-	-	-	-	228	22
10	27/07/87	13	-	-	-	-	-	273*	18
11	01/09/87	21	-	-	-	-	-	85	11
12	13/09/87	34	-	-	-	-	-	170	18
13	10/05/87	-	-	-	-	-	-	38	7
14	16/05/87	-	-	-	-	-	-	33	10
15	09/07/87	-	-	-	-	-	-	89	18
16	27/07/87	-	-	-	-	-	-	247*	53
17	01/09/87	-	-	-	-	-	-	50	7
18	13/09/87	-	-	-	-	-	-	54	14

a - Não analisado

b - TC = carbono total

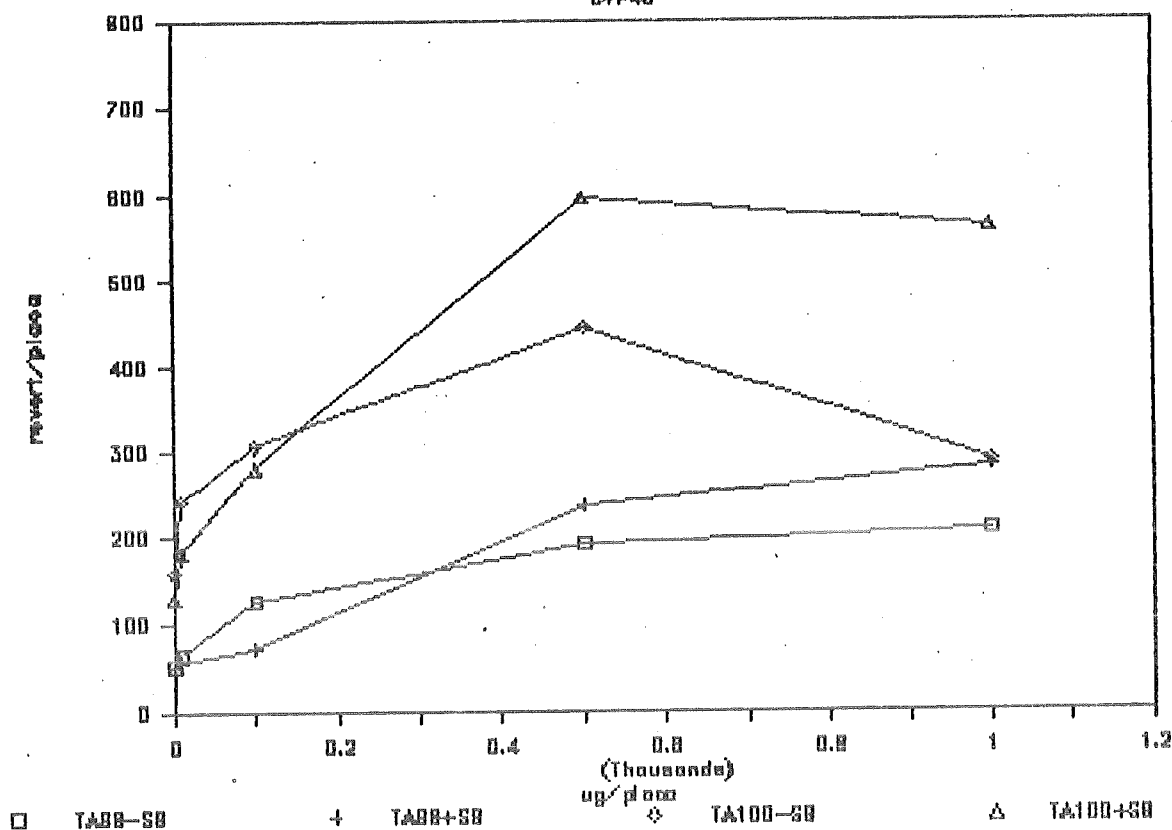
c - MP = material particulado (partículas totais em suspensão)

\* = valores acima do Padrão Nacional de Qualidade do Ar para 24 horas (CETESB, 1987).

† MOE = material orgânico extraído

## AMOSTRA 1

GPP40



## AMOSTRA 2

GPP41

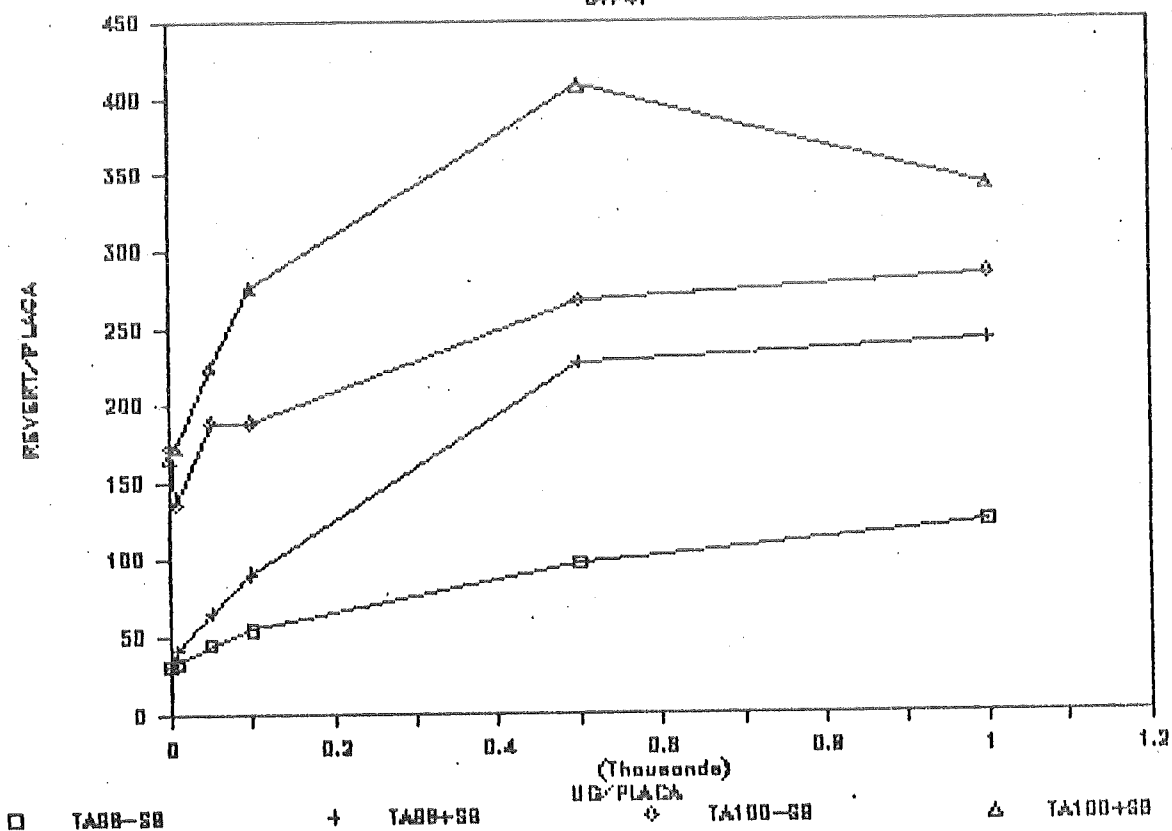
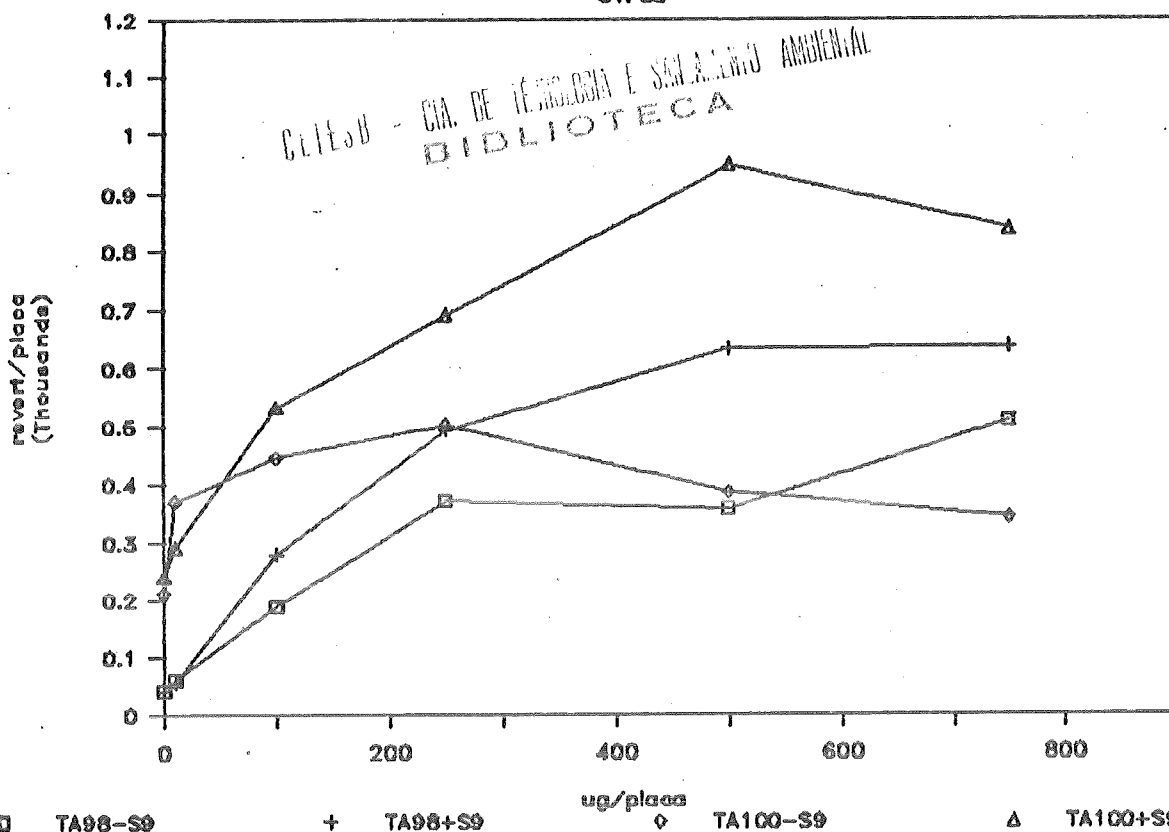


FIGURA 2. CURVA DOSE RESPOSTA OBTIDA NO TESTE DE AMES PARA AS 18 AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO ANALISADAS - Amostras 1 e 2.

## AMOSTRA 3

GVP50



## AMOSTRA 4

GVP53

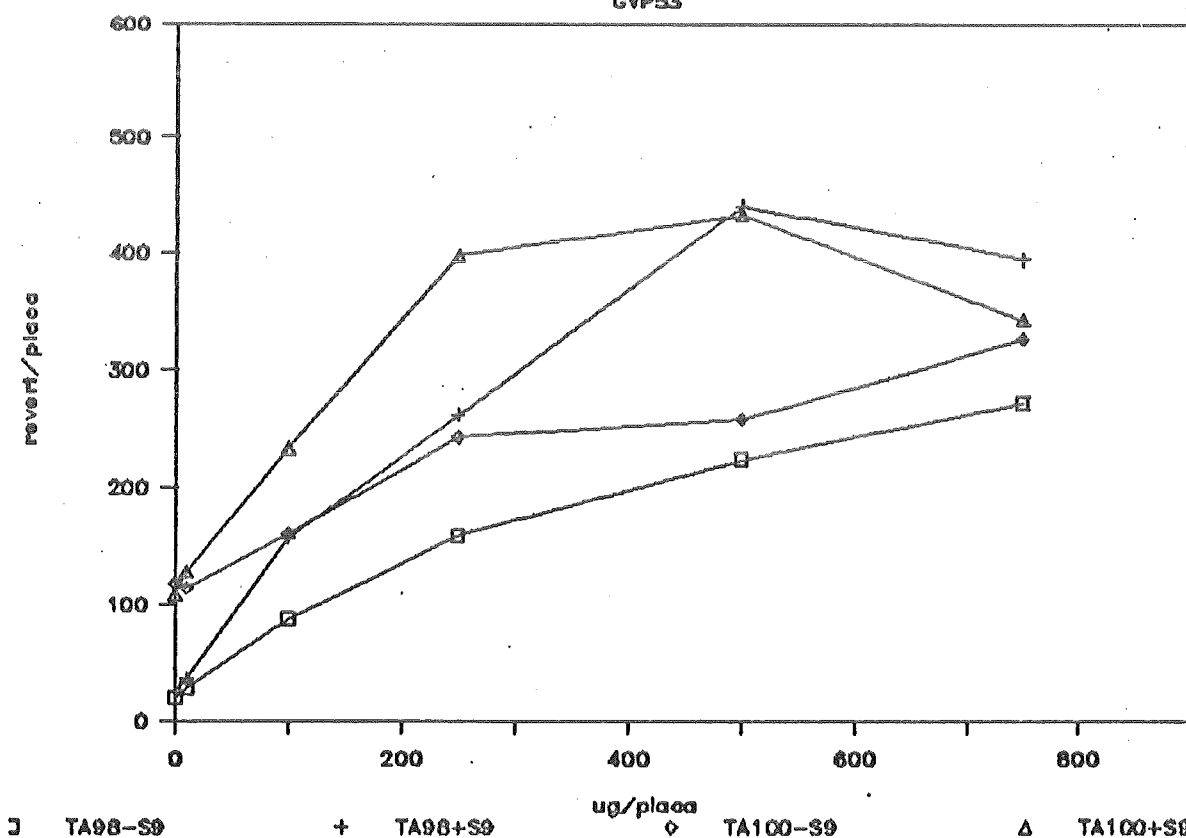
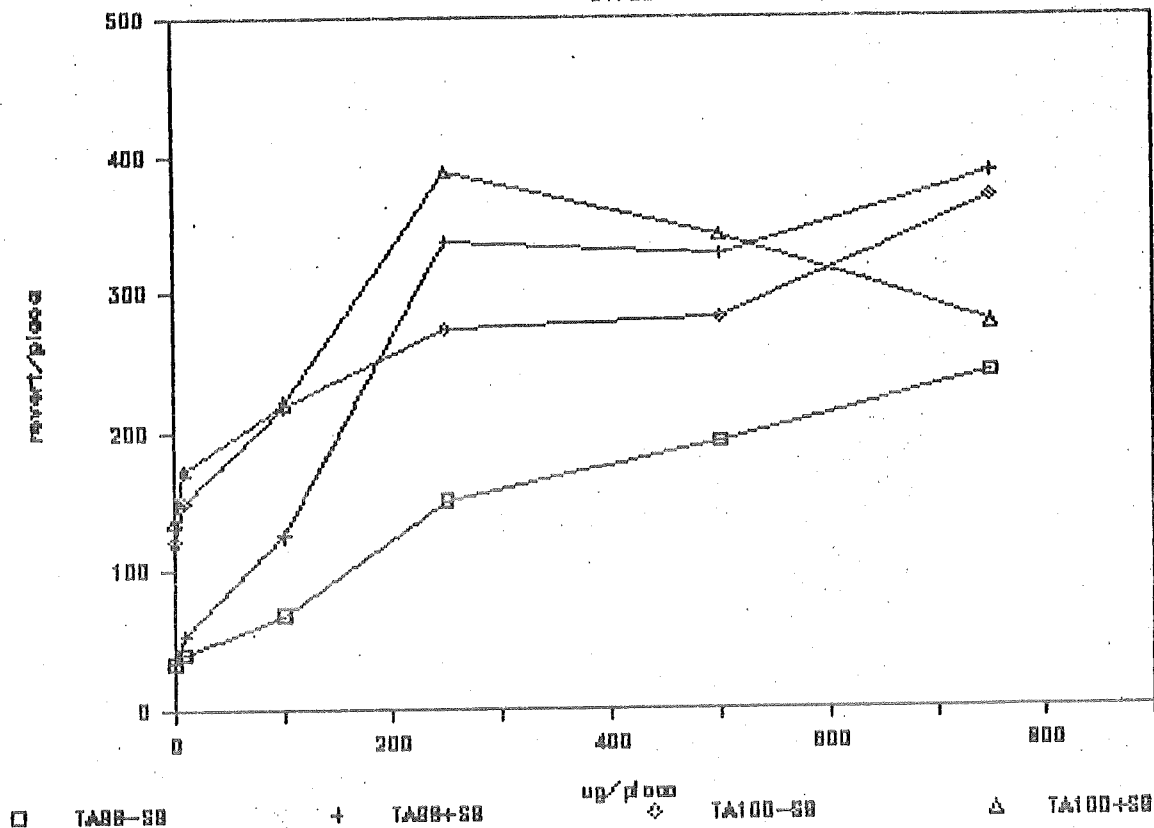


FIGURA 2. CURVA DOSE RESPOSTA OBTIDA NO TESTE DE AMES PARA AS 18 AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO ANALISADAS - Amostras 3 e 4 (Cont.).

## AMOSTRA 5

GVP59



## AMOSTRA 6

GVP61

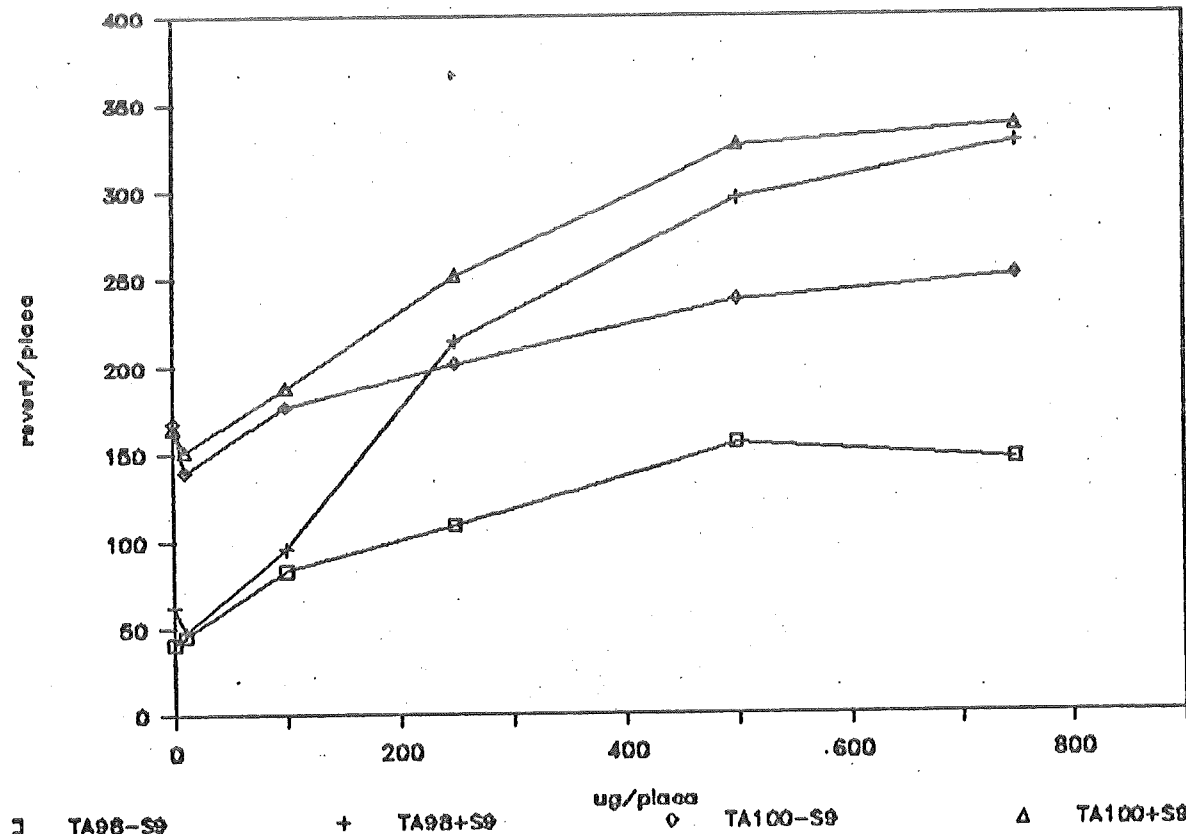
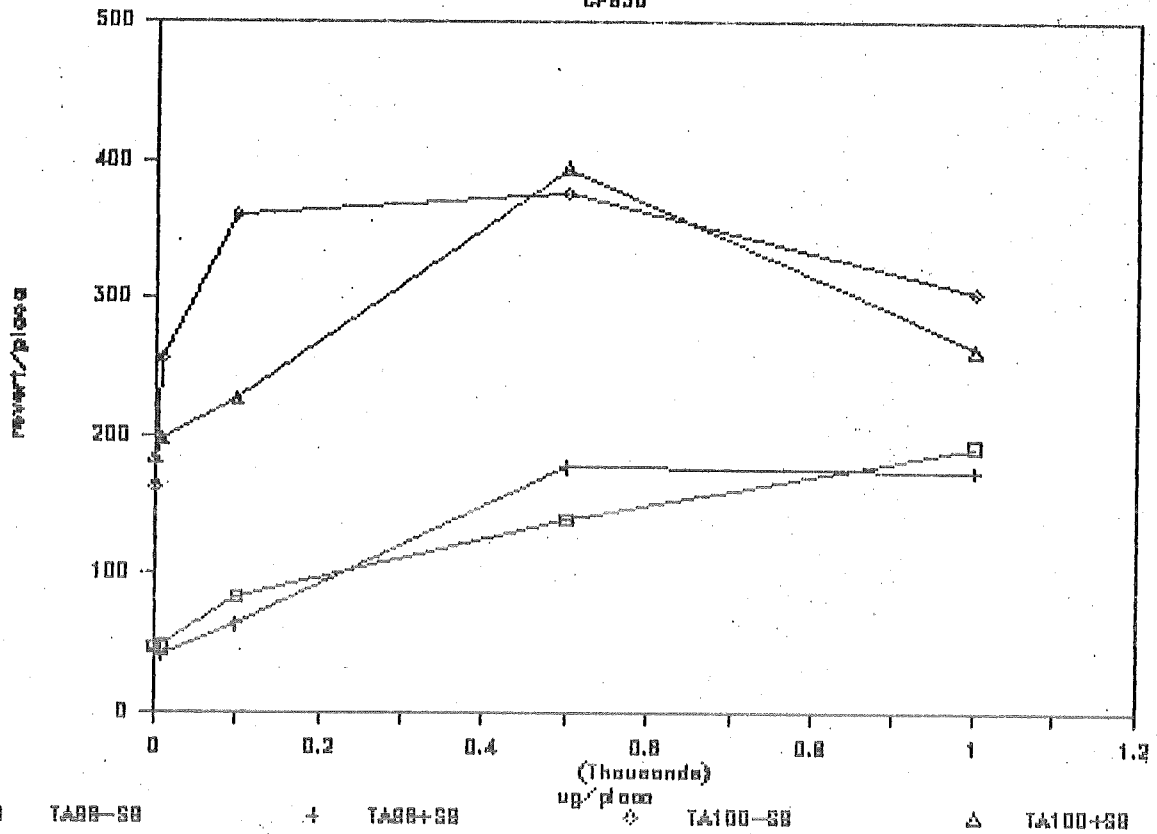


FIGURA 2. CURVA DOSE RESPOSTA OBTIDA NO TESTE DE AMES PARA AS 18 AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO ANALISADAS - Amostras 5 e 6 (Cont.).

## AMOSTRA 7

CPB30



## AMOSTRA 8

CPB31

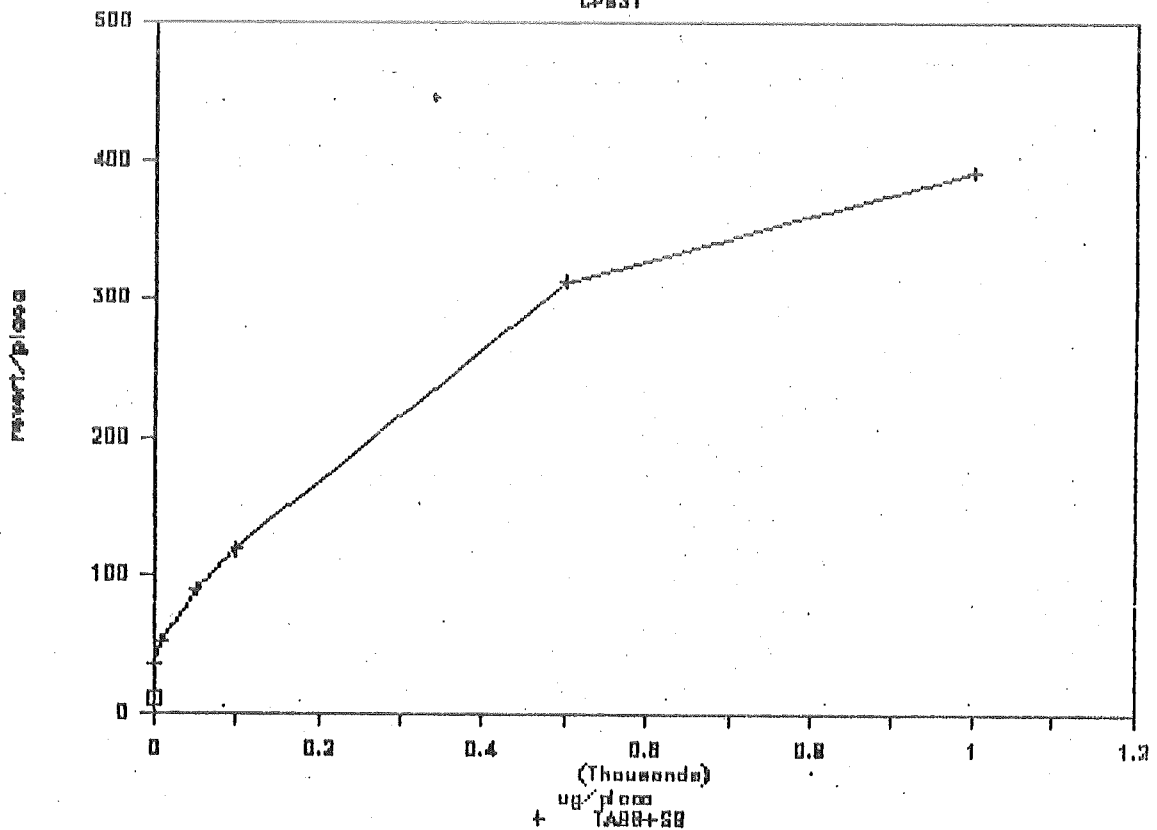
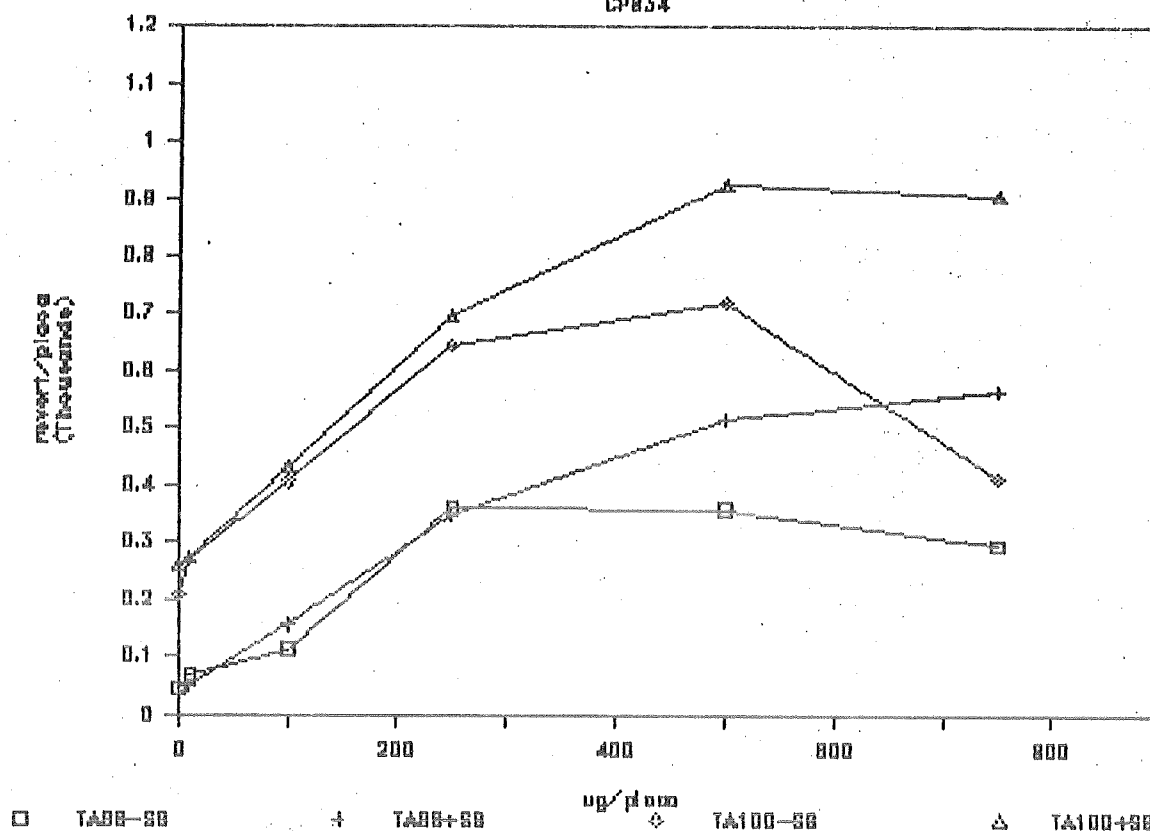


FIGURA 2. CURVA DOSE RESPOSTA OBTIDA NO TESTE DE AMES PARA AS 18 AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO ANALISADAS - Amostras 7 e 8 (Cont.),

## AMOSTRA 9

CPB34

30



## AMOSTRA 10

CPB37

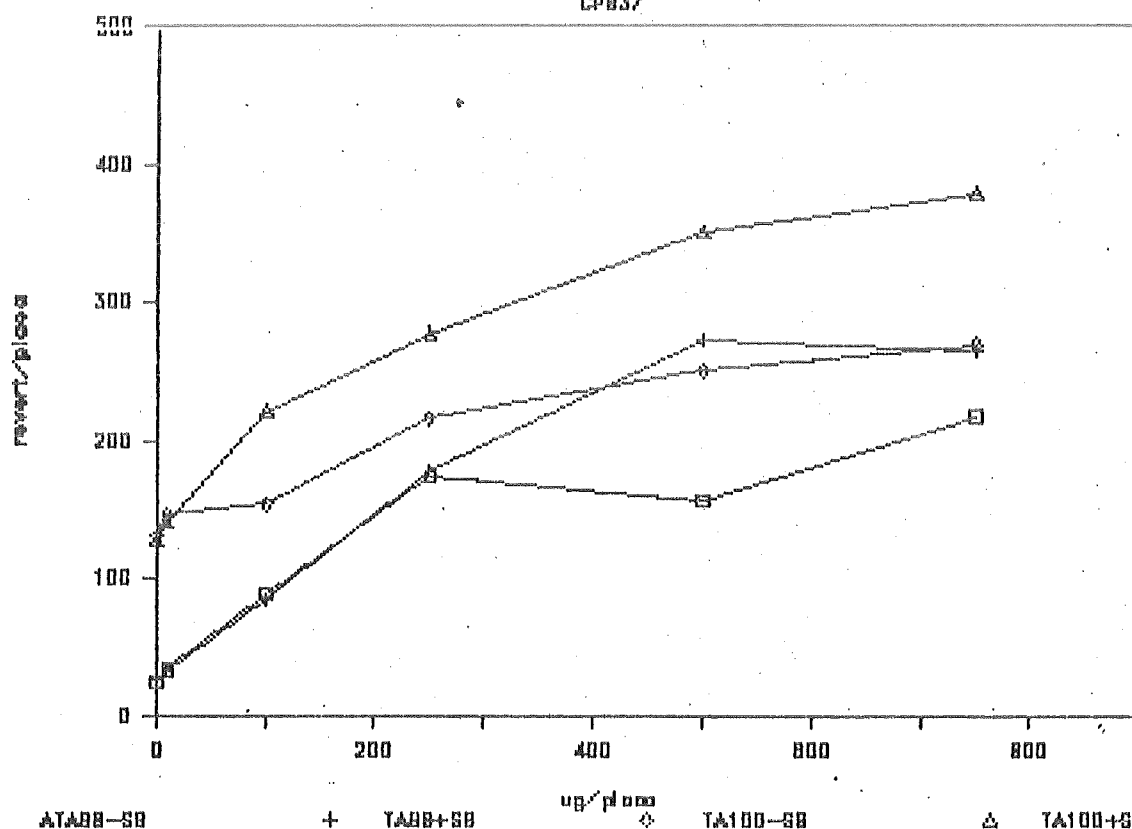
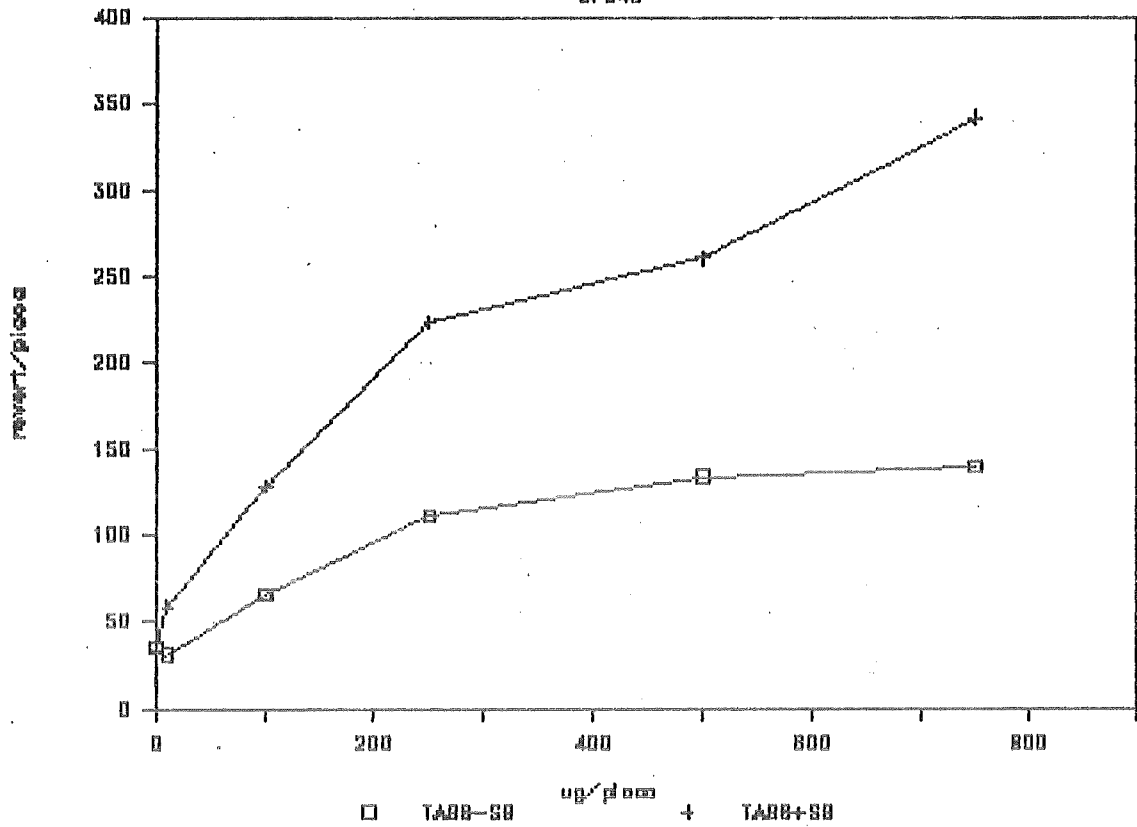


FIGURA 2. CURVA DOSE RESPOSTA OBTIDA NO TESTE DE AMES PARA AS 18 AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO ANALISADAS - Amostras 9 e 10 (Cont.).

## AMOSTRA 11

CPB45

31



## AMOSTRA 12

CPB45

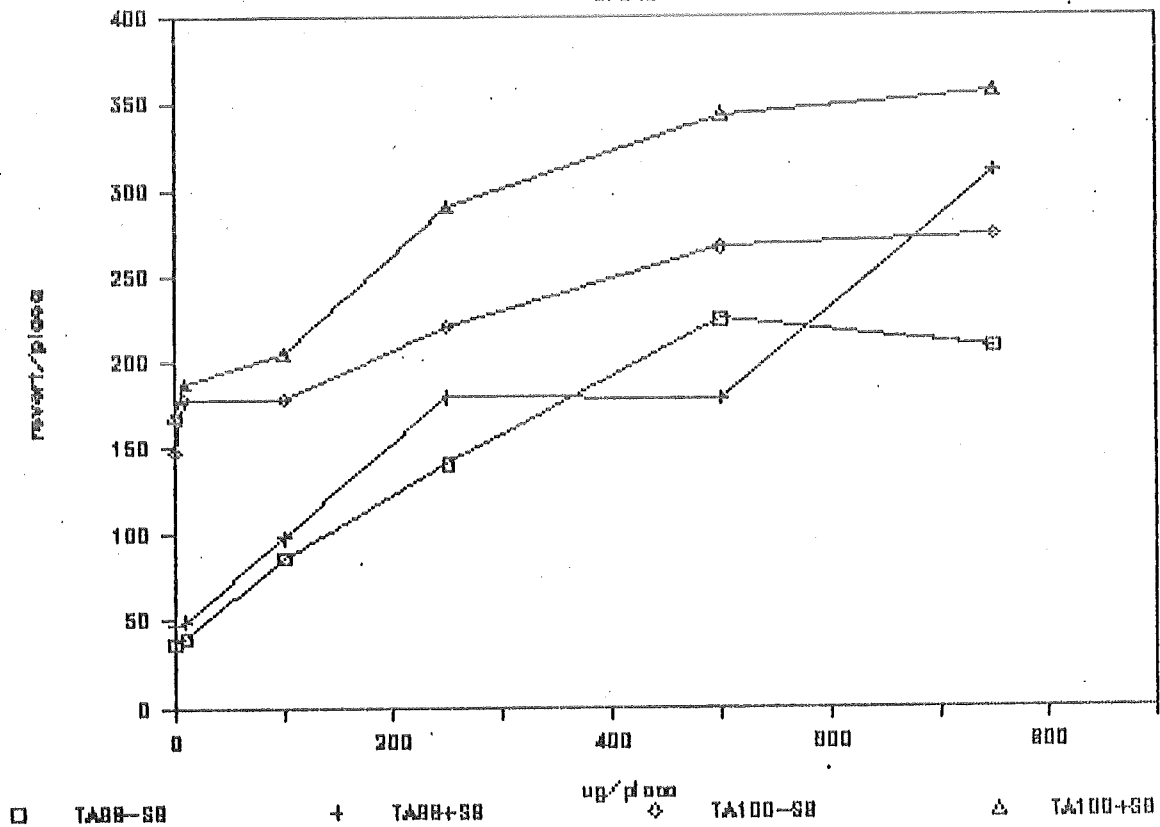
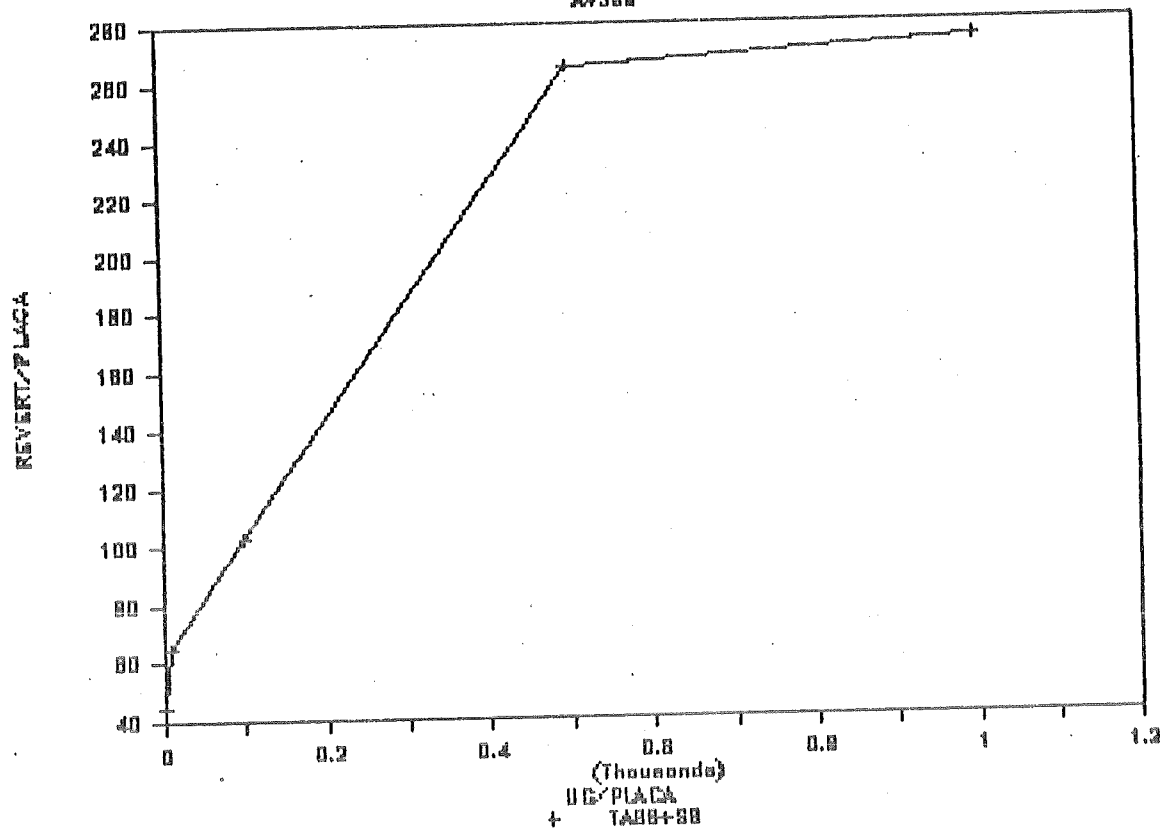


FIGURA 2. CURVA DOSE RESPOSTA OBTIDA NO TESTE DE AMES PARA AS 18 AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO ANALISADAS - Amostras 11 e 12 (Cont.) .

### AMOSTRA 13

AV300



### AMOSTRA 14

AV400

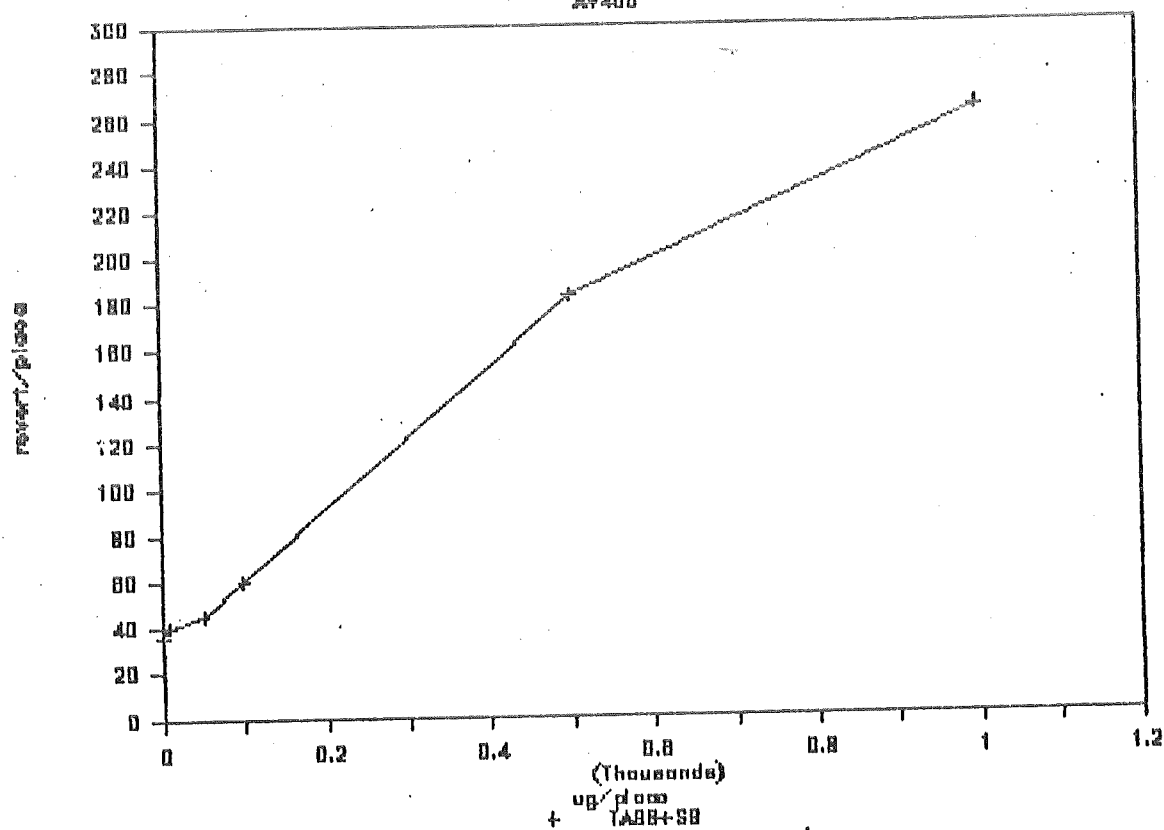
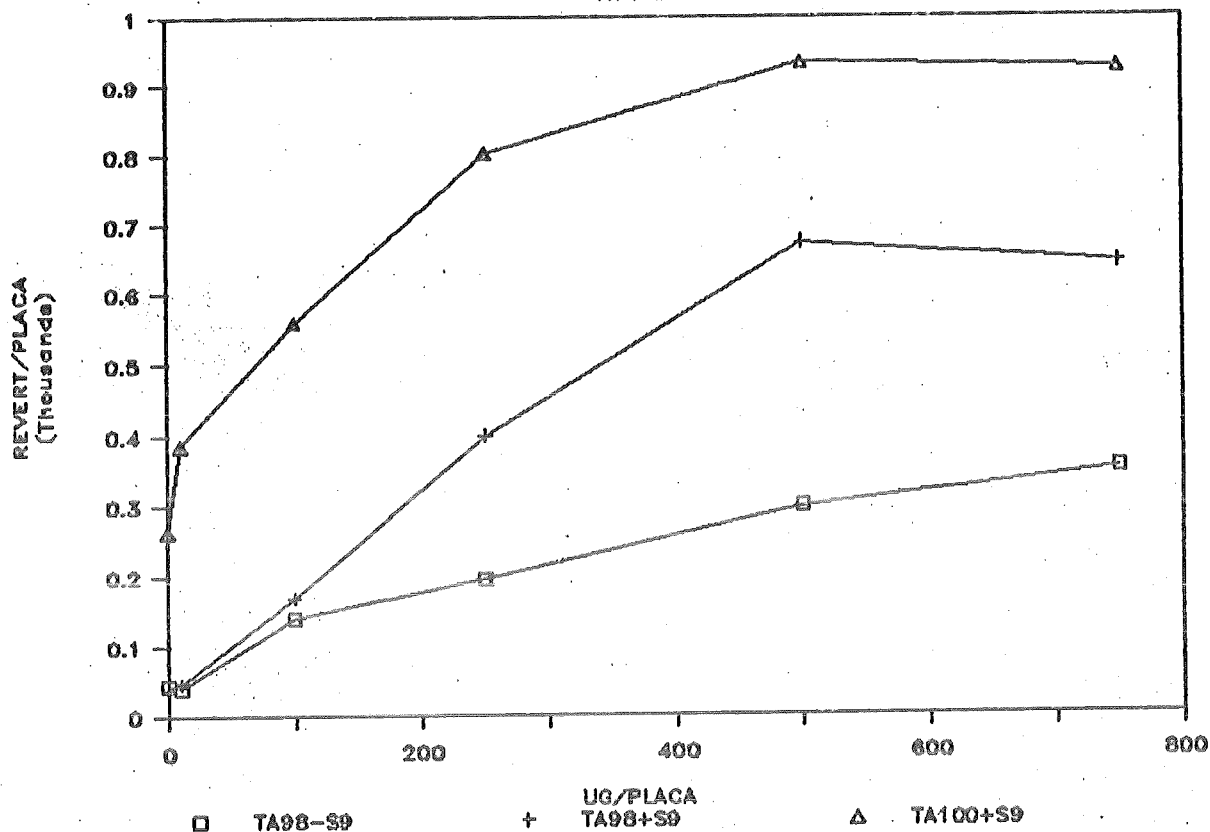


FIGURA 2. CURVA DOSE RESPOSTA OBTIDA NO TESTE DE AMES PARA AS 18 AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO ANALISADAS - Amostras 13 e 14 (Cont.).

### AMOSTRA 15

AV409



### AMOSTRA 16

AV412

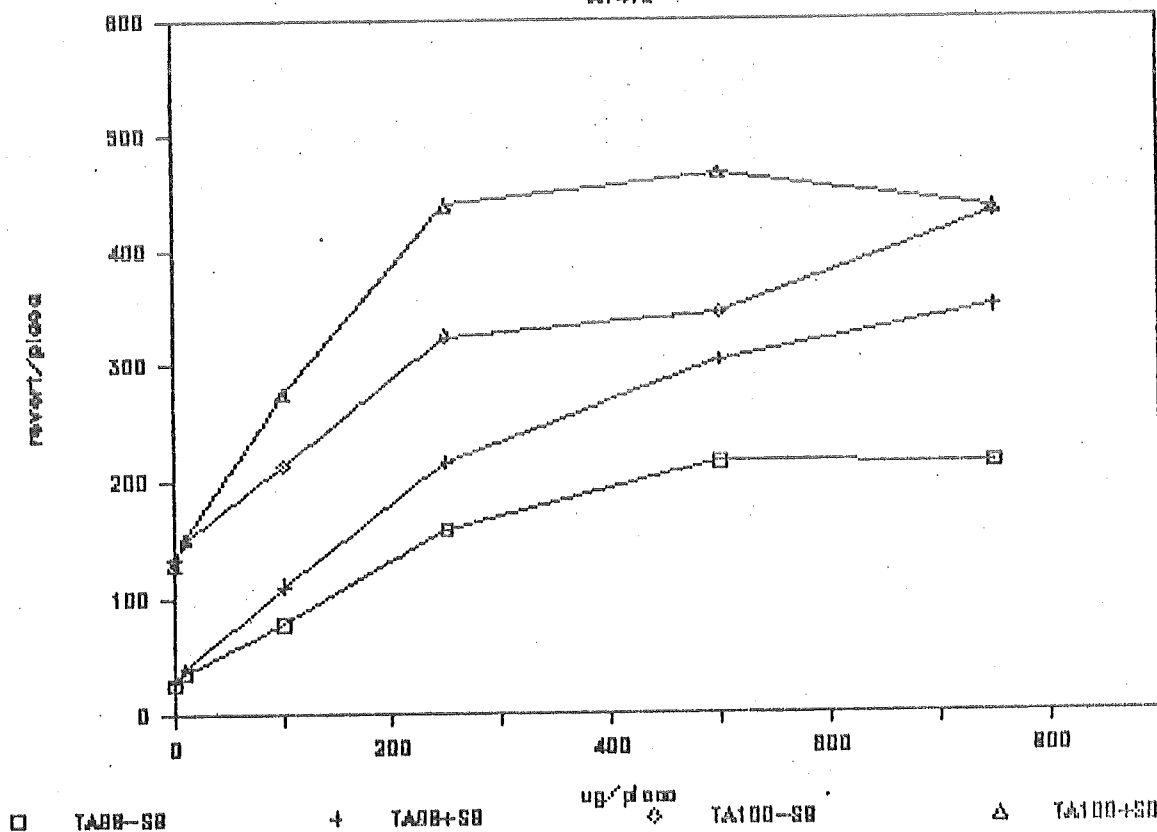
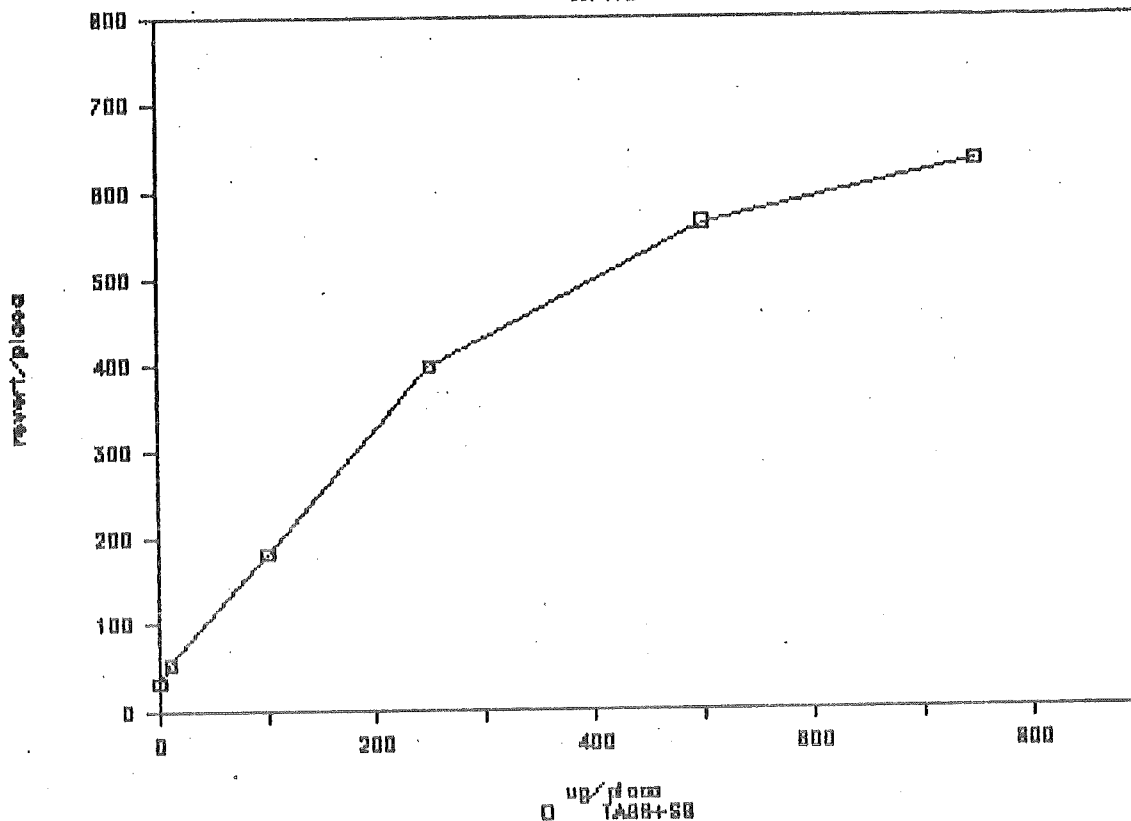


FIGURA 2. CURVA DOSE RESPOSTA OBTIDA NO TESTE DE AMES PARA AS 18 AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO ANALISADAS - Amostras 15 e 16 (Cont.).

### AMOSTRA 17

AV41B



### AMOSTRA 18

AV42D

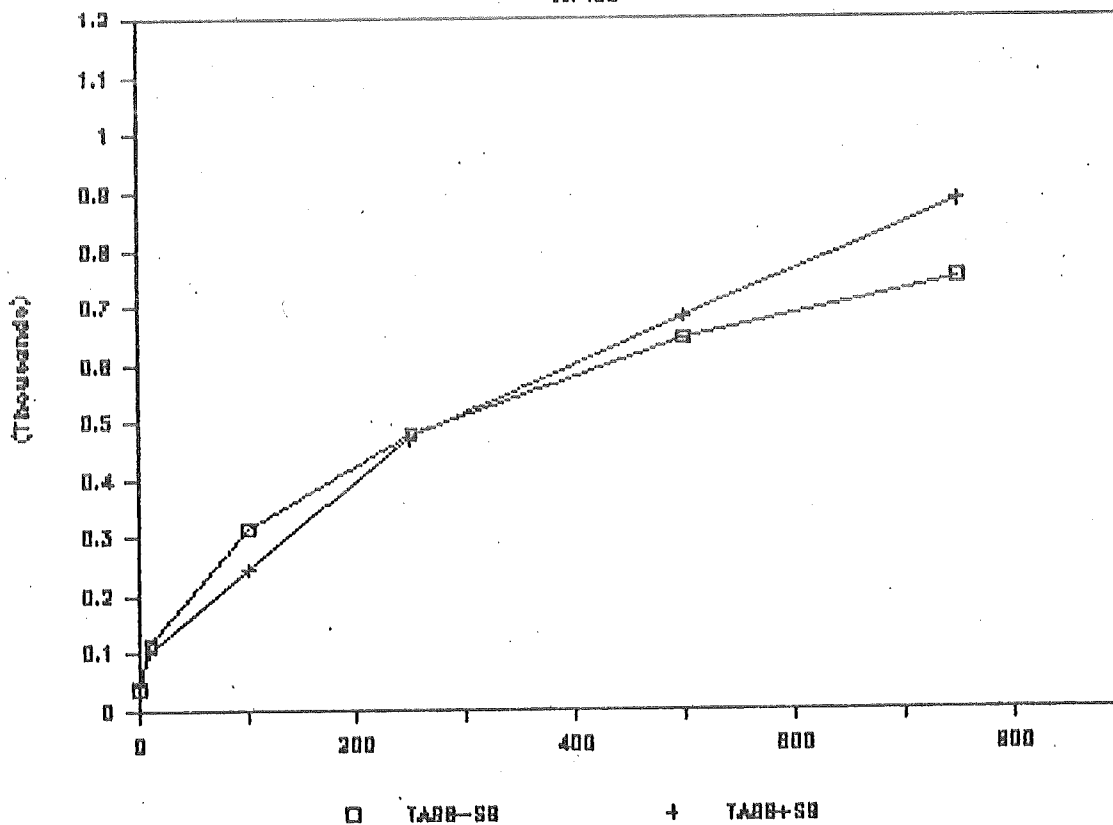


FIGURA 2. CURVA DOSE RESPOSTA OBTIDA NO TESTE DE AMES PARA AS 18 AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO ANALISADAS - Amostras 17 e 18 (Cont.),

CETESB - CIA. DE T CNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL  
BIBLIOTECA

TABELA 3. ATIVIDADE MUTAG NICA DOS EXTRATOS DAS 18 AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO ANALISADAS PELO TESTE DE AMES.

AMOSTRA	CEPA	RETA REGRESSÃO	N <sup>a</sup>	r <sup>b</sup>	CLASSIFICAÇÃO <sup>c</sup>
1	TA98 - S9	y= 0,23x + 82,34	8	0,927190 ***	+
	TA98 + S9	y= 0,37x + 47,25	9	0,985404 ***	+
	TA100 - S9	y= 0,39x + 249,80	8	0,850986 **	+
	TA100 + S9	y= 0,83x + 185,34	9	0,979777 ***	+
2	TA98 - S9	y= 0,09x + 41,17	15	0,967782 ***	+
	TA98 + S9	y= 0,37x + 45,83	12	0,945521 **	+
	TA100 + S9	y= 0,13x + 169,23	15	0,786039 ***	+/-
	TA100 + S9	y= 0,43x + 199,51	12	0,874820 ***	+
3	TA98 - S9	y= 1,28x + 53,29	9	0,977697 ***	+
	TA98 + S9	y= 1,78x + 62,85	9	0,949780 ***	+
	TA100 + S9	y= 0,54x + 374,25	9	0,796722 *	+
	TA100 + S9	y= 1,26x + 344,38	12	0,922571 ***	+
4	TA98 - S9	y= 0,53x + 27,71	9	0,979796 ***	+
	TA98 + S9	y= 0,91x + 42,21	9	0,959100 ***	+
	TA100 + S9	y= 0,54x + 107,77	9	0,897966 ***	+
	TA100 + S9	y= 1,12x + 118,25	9	0,990770 ***	+
5	TA98 + S9	y= 0,27x + 51,37	15	0,962235 ***	+
	TA98 + S9	y= 1,20x + 27,23	9	0,985169 ***	+
	TA100 - S9	y= 0,50x + 152,82	9	0,939332 ***	+
	TA100 + S9	y= 0,92x + 149,10	9	0,974016 ***	+
6	TA98 - S9	y= 0,21x + 52,66	12	0,952384 ***	+
	TA98 + S9	y= 0,53x + 51,16	11	0,962353 ***	+
	TA100 - S9	y= 0,14x + 155,49	15	0,936381 ***	+/-
	TA100 + S9	y= 0,35x + 154,25	11	0,962796 ***	+
7	TA98 - S9	y= 0,14x + 59,96	12	0,947674 ***	+
	TA98 + S9	y= 0,28x + 35,95	9	0,997748 ***	+
	TA100 - S9	-	-	0,531168 n.s.	+/-
	TA100 + S9	y= 0,41x + 190,10	9	0,965290 ***	+

<sup>a</sup> = n mero de observa es

<sup>b</sup> = coeficiente de correla o (\* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; n.s. = n o significativo)

<sup>c</sup> + = resultado positivo

+/- = resultado marginal

TABELA 3. ATIVIDADE MUTAGÊNICA DOS EXTRATOS DAS 18 AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO ANALISADAS PELO TESTE DE AMES (Continuação).

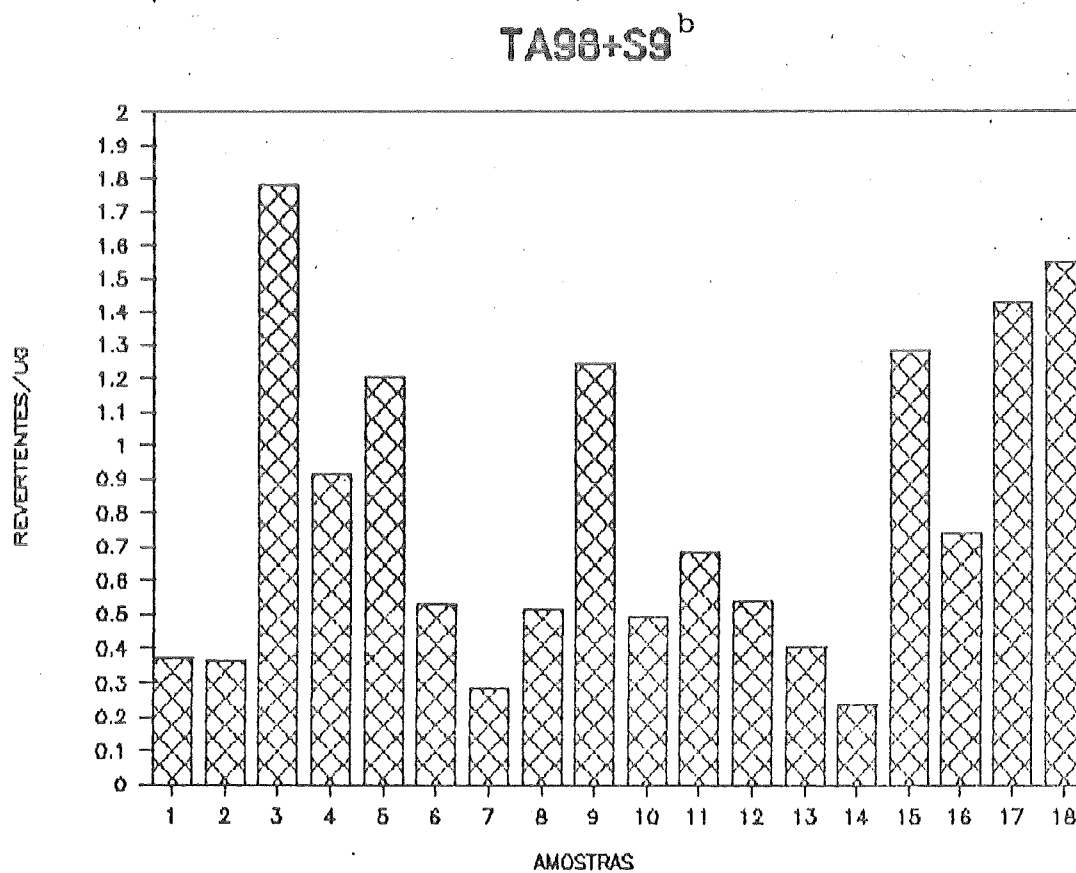
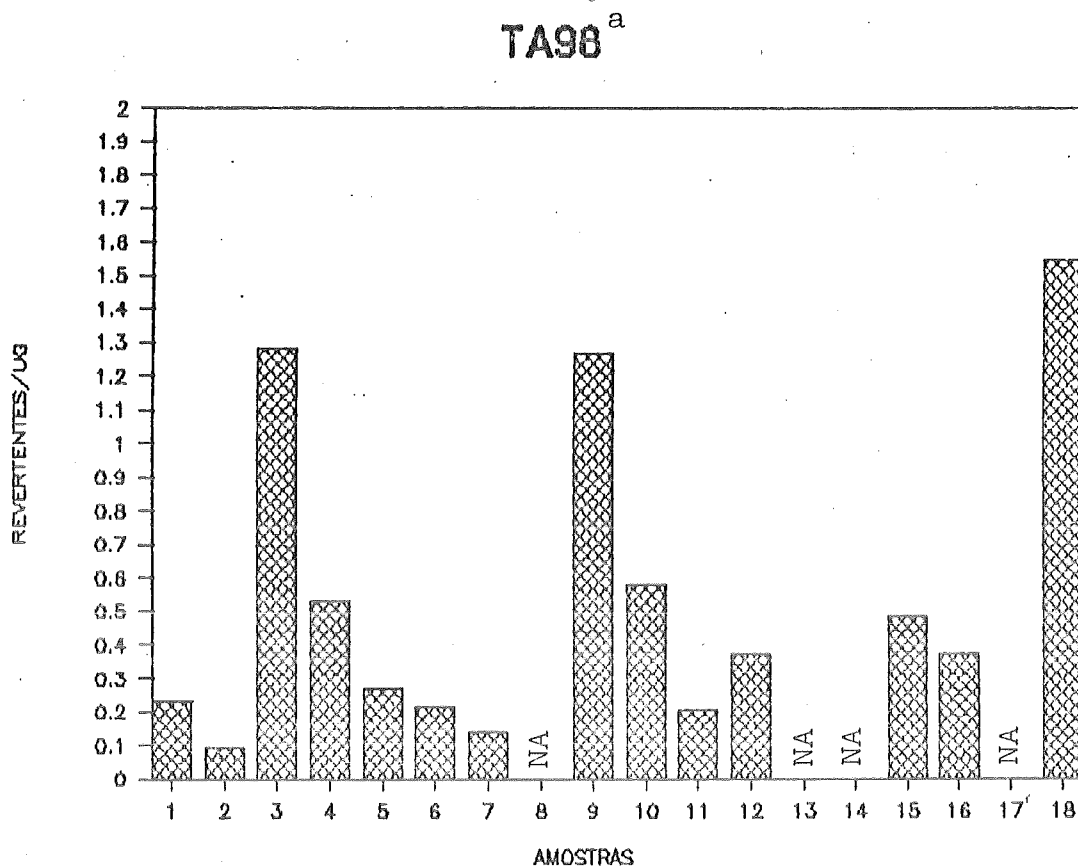
AMOSTRA	CEPA	RETA DE REGRESSÃO	N <sup>a</sup>	r <sup>b</sup>	CLASSIFICAÇÃO <sup>c</sup>
8	TA98 + S9	y= 0,52x + 58,27	11	0,992018 ***	+
9	TA98 - S9	y= 1,27x + 28,26	9	0,955284 ***	+
	TA98 + S9	y= 1,25x + 34,20	9	0,992325 ***	+
	TA100 - S9	y= 1,58x + 250,78	9	0,960220 ***	+
	TA100 + S9	y= 1,33x + 298,49	12	0,964873 ***	+
10	TA98 + S9	y= 0,58x + 28,89	9	0,976609 ***	+
	TA98 + S9	y= 0,49x + 136,12	12	0,988361 ***	+
	TA100 + S9	y= 0,18x + 150,56	15	0,900084 ***	+
	TA100 + S9	y= 0,55x + 147,97	9	0,921163 ***	+
11	TA98 + S9	y= 0,20x + 41,90	12	0,947189 ***	+
	TA98 + S9	y= 0,68x + 55,15	9	0,971754 ***	+
12	TA98 - S9	y= 0,37x + 43,51	12	0,980235 ***	+
	TA98 + S9	y= 0,54x + 44,61	9	0,980039 ***	+
	TA100 + S9	y= 0,19x + 170,65	11	0,941155 ***	+/-
	TA100 + S9	y= 0,33x + 184,40	12	0,904154 ***	+
13	TA98 + S9	y= 0,41x + 61,81	8	0,979247 ***	+
14	TA98 + S9	y= 0,23x + 40,42	15	0,971808 ***	+
15	TA98 - S9	y= 0,49x + 63,19	12	0,946330 ***	+
	TA98 - S9	y= 1,28x + 45,73	12	0,982230 ***	+
	TA100 - S9	y= 1,09x + 434,66	12	0,900021 ***	+
16	TA98 - S9	y= 0,37x + 41,68	12	0,962368 ***	+
	TA98 + S9	y= 0,74x + 32,76	9	0,982154 ***	+
	TA100 - S9	y= 0,73x + 140,85	9	0,981672 ***	+
	TA100 + S9	y= 1,19x + 145,90	9	0,979268 ***	+
17	TA98 + S9	y= 1,43x + 40,39	8	0,988396 ***	+
18	TA98 - S9	y= 1,55x + 86,51	9	0,993624 ***	+
	TA98 + S9	y= 1,55x + 86,39	8	0,991925 ***	+

a = número de observações

b = coeficiente de correlação (\*\*\*) p < 0,001

c + = resultado positivo

+/- = resultado marginal



**FIGURA 3.** ATIVIDADE MUTAGÊNICA DAS 18 AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO FRENTE A CEPA TA98 NA AUSÊNCIA (a) E PRESENÇA (b) DE FRAÇÃO S9 EXPRESSA EM REVERTENTES/ $\mu\text{g}$

NA - amostra não analisada, devido a insuficiência de material orgânico extraído.

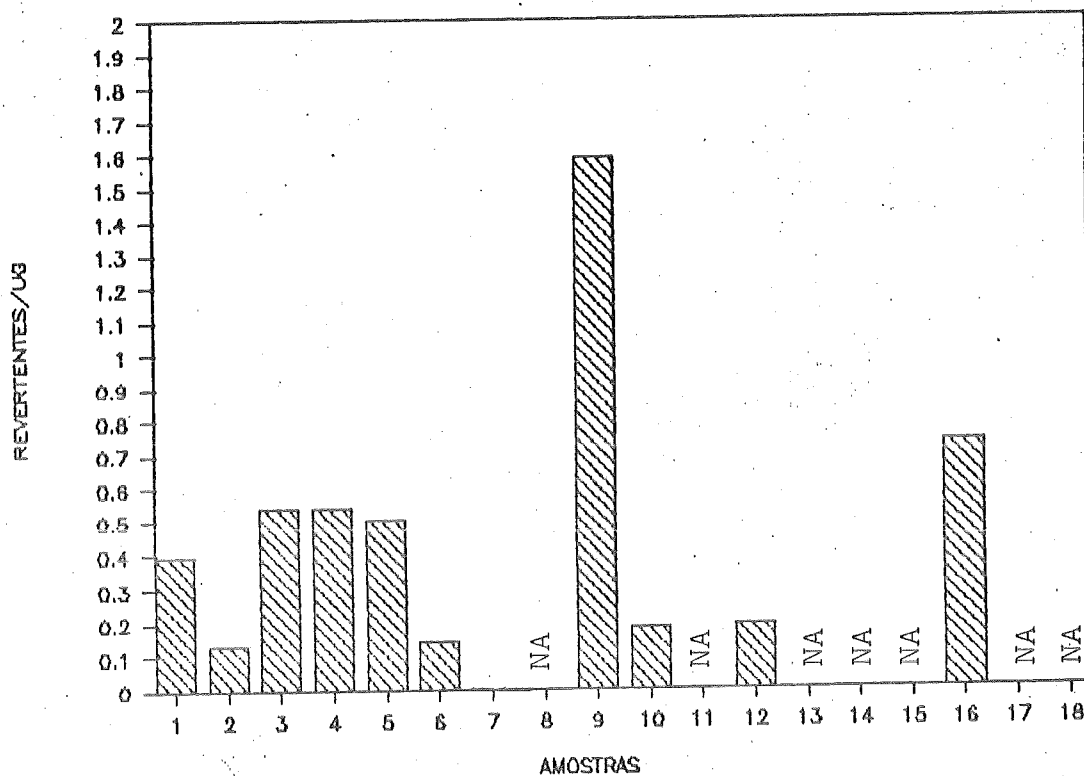
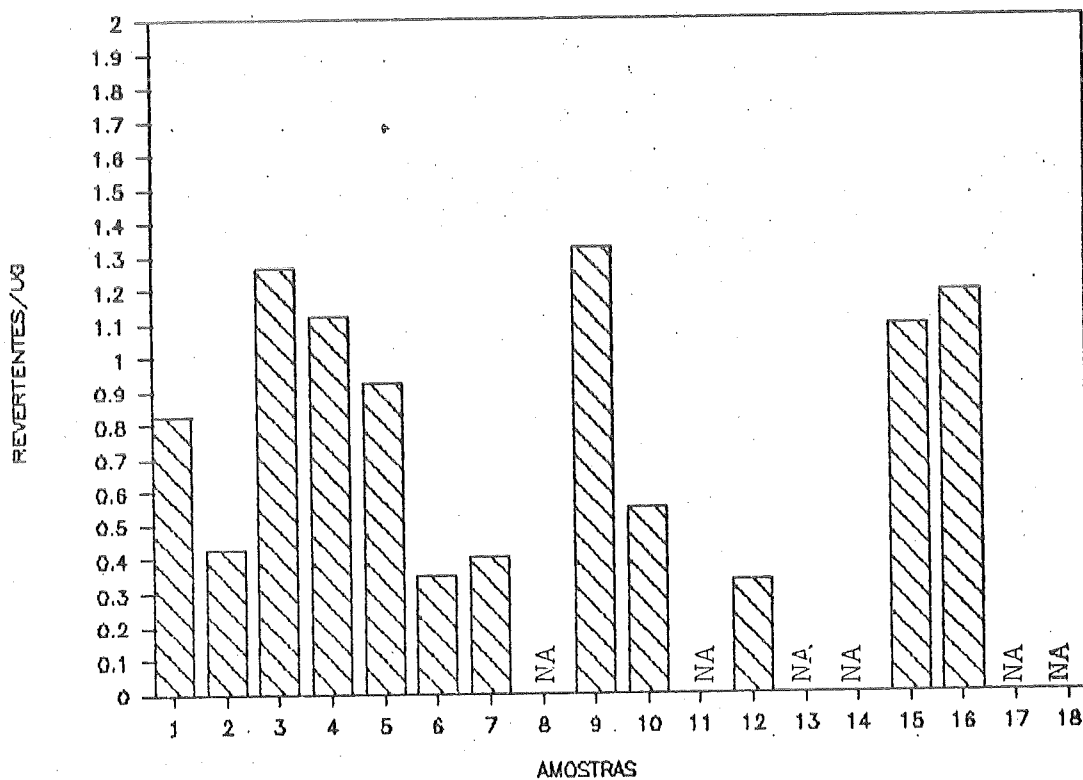
**TA100<sup>a</sup>**

**TA100+S9<sup>b</sup>**


FIGURA 4. ATIVIDADE MUTAGÊNICA DAS 18 AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO FRENTE A CEPA TA100 NA AUSÊNCIA (a) E PRESENÇA (b) DE FRAÇÃO S9 EXPRESSA EM REVERTENTES/ $\mu$ g

NA - amostra não analisada, devido a insuficiência de material orgânico extraído.

TABELA 4. EFEITO DA ATIVAÇÃO METABÓLICA NA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DAS AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO DE CUBATÃO E SÃO PAULO

Cepa	Porcentagem de Aumento <sup>a,b</sup>		
	São Paulo	Cubatão	Total
TA98	73	14	58
TA100	107	13	69
$\bar{x}^c$	90	13	63

a = Cálculo da porcentagem  $\frac{\text{rev}/\mu\text{g} (+S9) - \text{rev}/\mu\text{g} (-S9) \times 100}{\text{rev}/\mu\text{g} (-S9)}$

b = Os valores são as médias dos pontos de coleta de cada local

c = Média dos dados das duas cepas

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL  
BIBLIOTECA

TABELA 5. RESULTADOS DO TESTE DE AMES EXPRESSOS EM CME ( $\mu\text{g}/\text{placa}$ ) DAS 18 AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO TESTADAS

Número da Amostra	CME <sup>a</sup> ( $\mu\text{g}$ de extrato)			
	TA98 - S9	TA98 + S9	TA100 - S9	TA100 + S9
1	103	145	173	89
2	220	39	+/- <sup>d</sup>	307
3	25	11	90	107
4	24	9	238	89
5	57	33	178	134
6	138	139	+/-	498
7	227	187	+/-	433
8	NA <sup>b</sup>	27	NA	NA
9	48	28	105	170
10	36	38	629	196
11	138	16	AI <sup>e</sup>	AI
12	79	97	+/-	463
13	NA	66	NA	NA
14	NA	135	NA	NA
15	52	18	NA	81
16	23	30	165	92
17	NA	18	NA	NA
18	NC <sup>c</sup>	7	NA	NA

a = CME: Concentração mínima efetiva

b = NA: Amostra não analisada devido a volume insuficiente de material orgânico extraído,

c = NC: Valor CME não calculado (ver tabela B54 )

d = +/-: Resultado marginal

e = Amostra insuficiente para análise.

TABELA 6. RANK DAS AMOSTRAS DE EXTRATO DE MATERIAL PARTICULADO COM RELAÇÃO À ATIVIDADE MUTAGÊNICA (REVERTENTES/m<sup>3</sup>) E À QUANTIDADE DE MATERIAL PARTICULADO DE AR (µg/m<sup>3</sup>)

Rank	Atividade Mutagênica (TA98+S9) (revertentes/m <sup>3</sup> )	Material Particulado (MP) <sup>a</sup> (µg/m <sup>3</sup> )
1	3	4 *
2	4	7 *
3	16	10 *
4	5	16 *
5	9	9
6	15	12
7	18	3
8	7	5
9	6	8
10	12	2
11	1	15
12	10	11
13	17	6
14	2	1
15	11	18
16	8	17
17	13	13
18	14	14

<sup>a</sup> MP = material particulado

\* = valores acima do padrão nacional de qualidade do ar (CETESB, 1987).

### TESTE

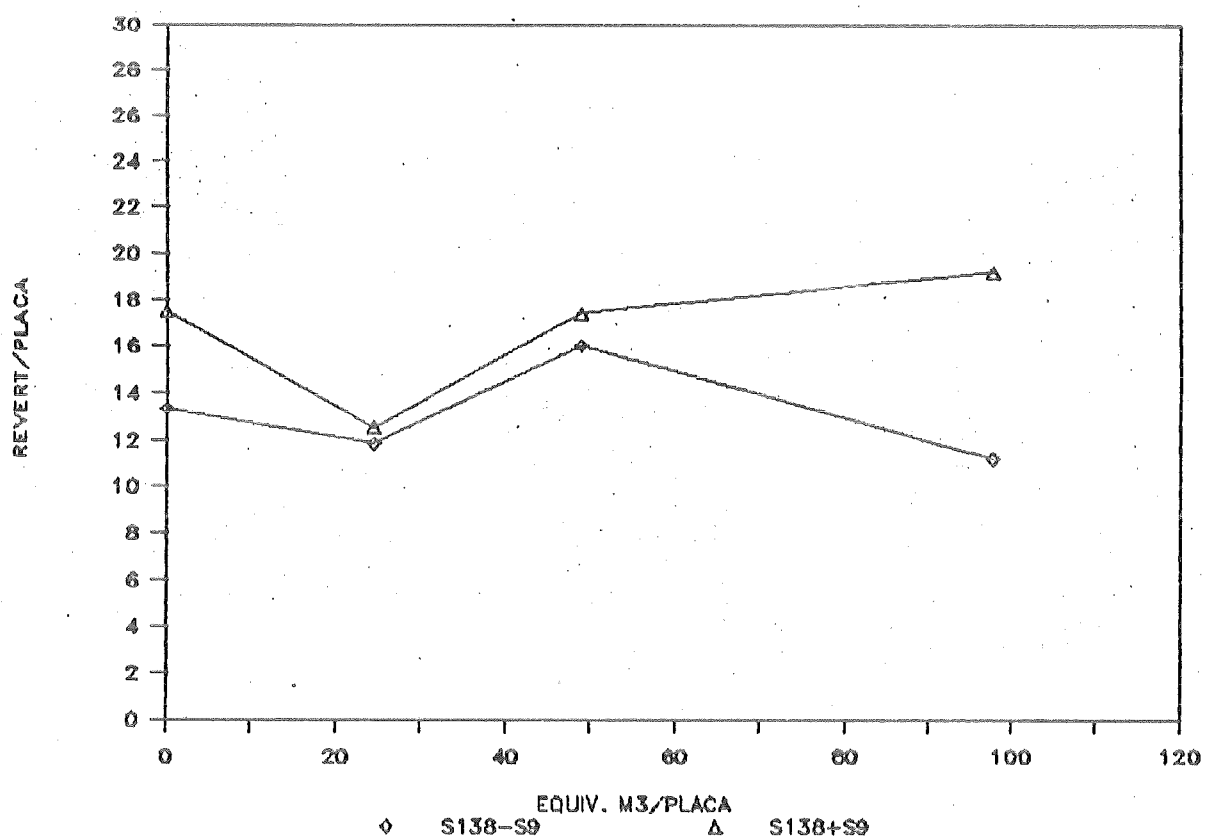
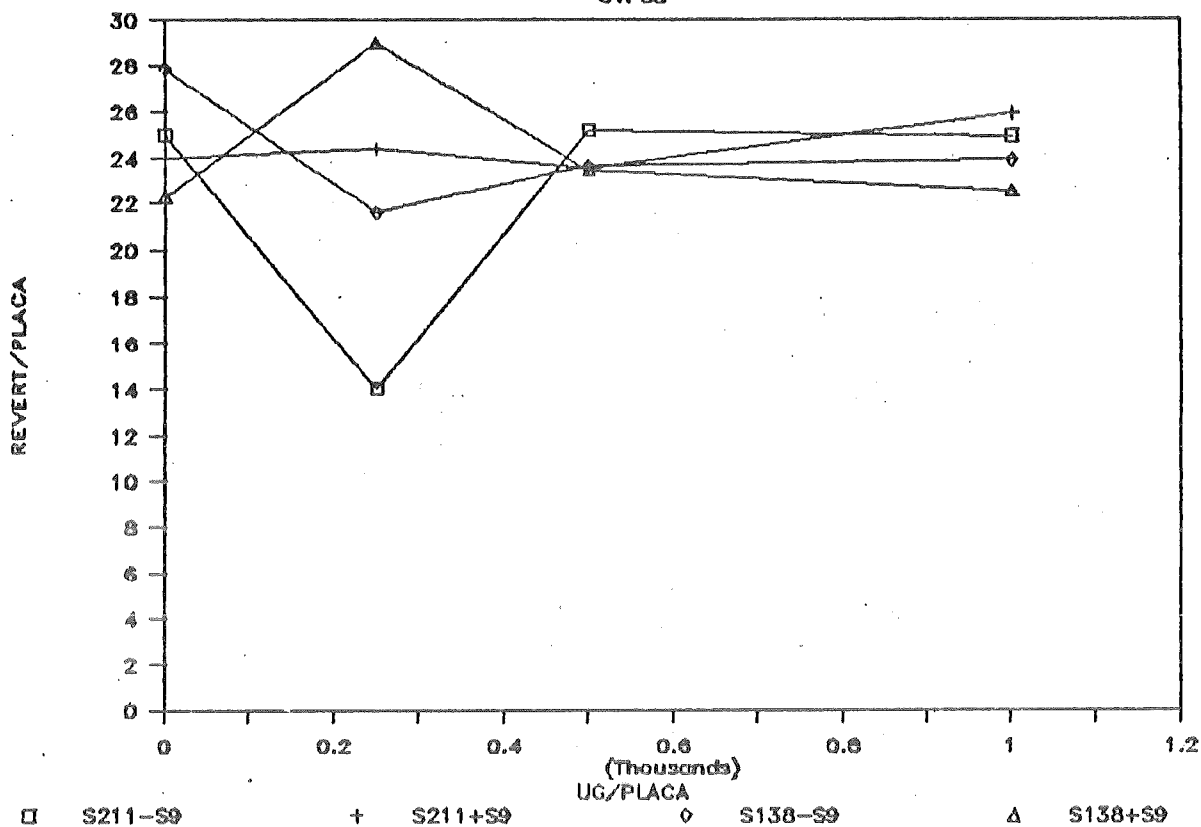


FIGURA 5. CURVA DOSE RESPOSTA DA AMOSTRA-TESTE PARA A CEPA S138 NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE FRAÇÃO S9.

## AMOSTRA 4

GVP53



## AMOSTRA 7

CP630

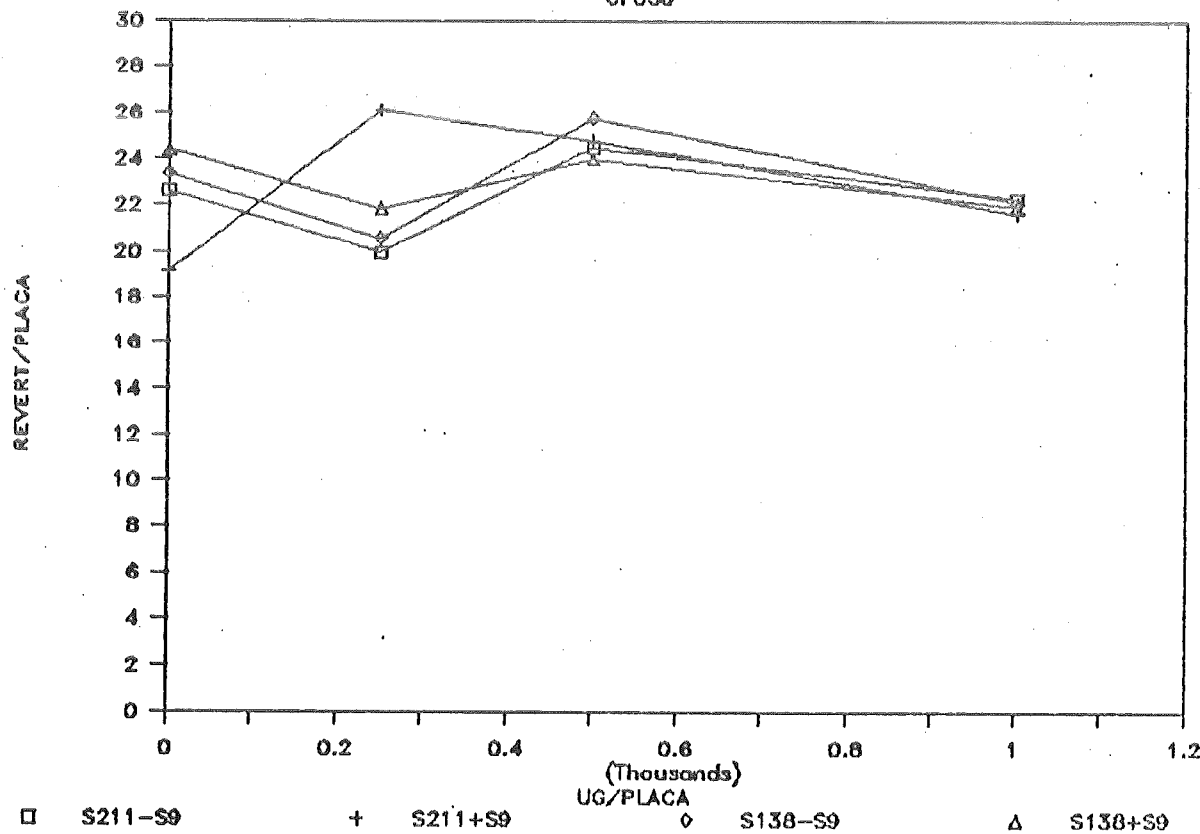
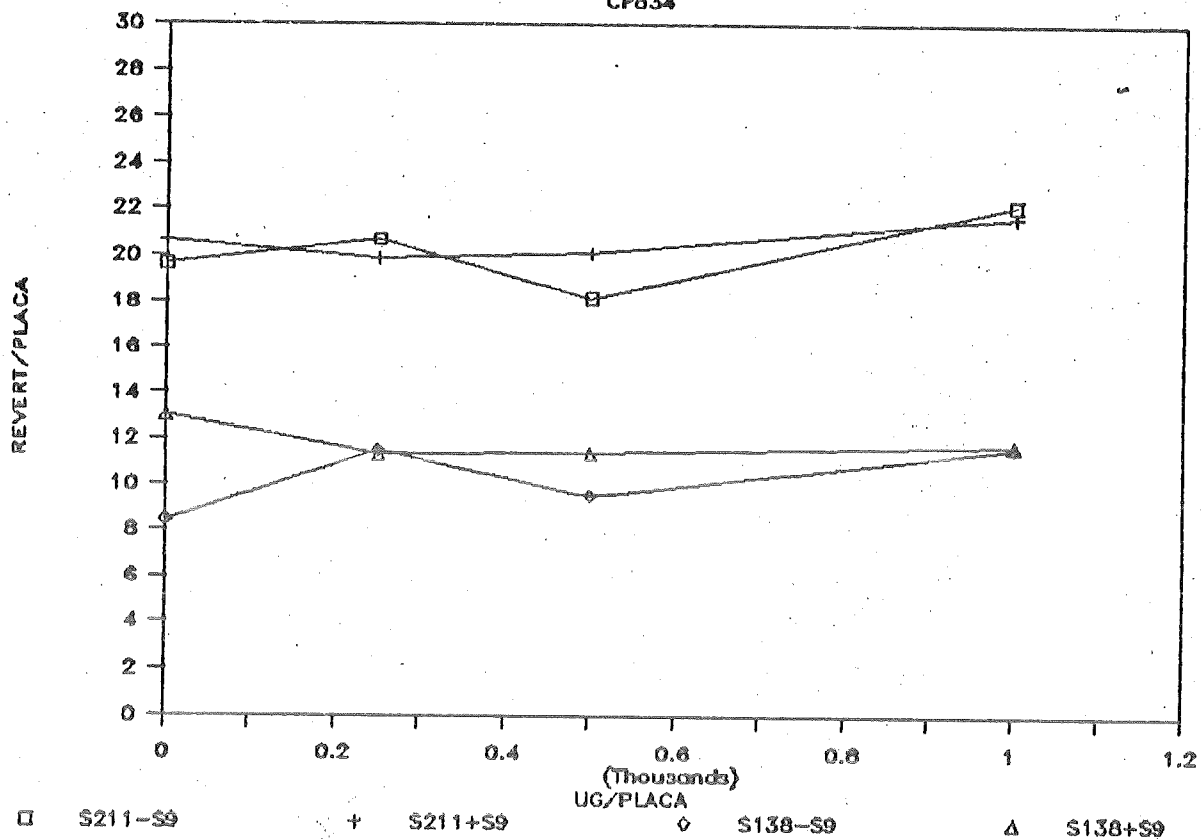


FIGURA 6. CURVA DOSE RESPOSTA DOS EXTRATOS DE MATERIAL PARTICULADO FRENTE AS CEPAS S211 E S138 NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE FRAÇÃO S9.

## AMOSTRA 9

44

CP834



## AMOSTRA 16

AV412

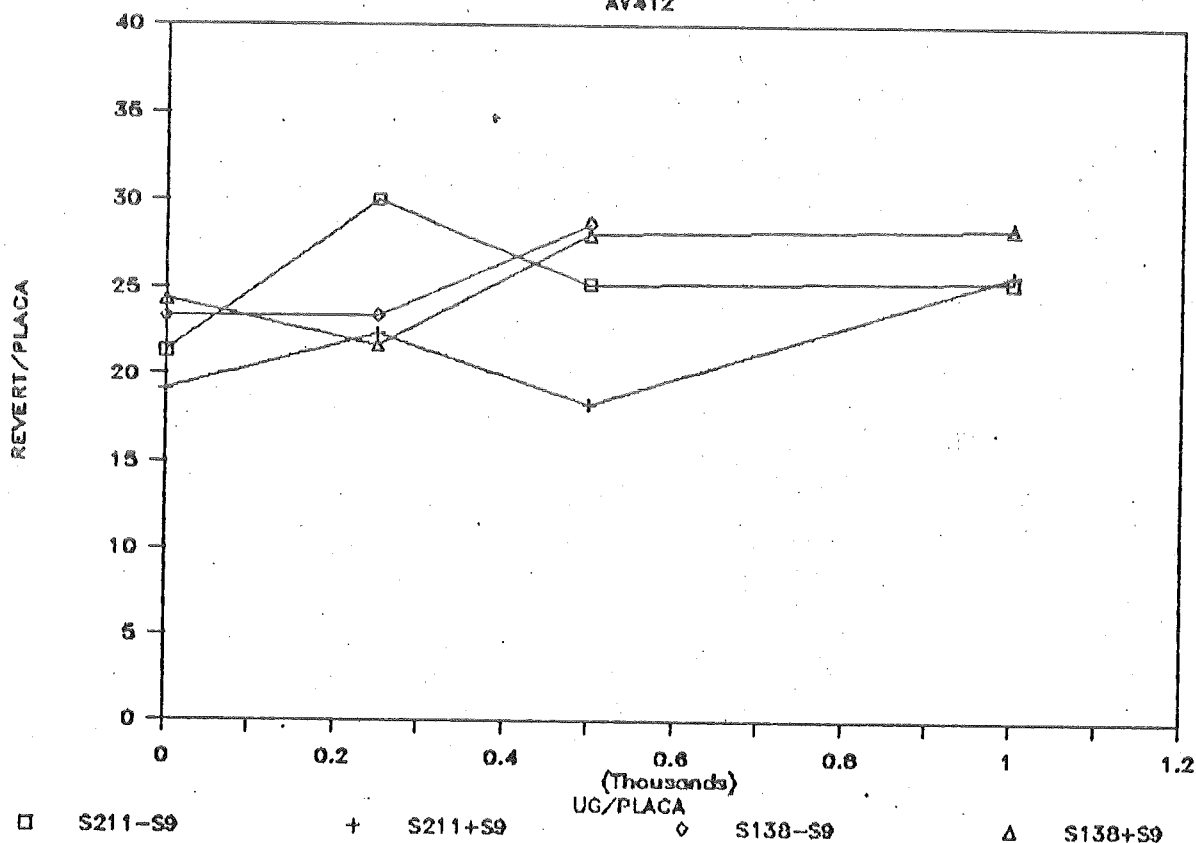


FIGURA 6. CURVA DOSE RESPOSTA DOS EXTRATOS DE MATERIAL PARTICULADO FRENTE AS CEPAS S211 E S138 NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE FRAÇÃO S9 (Cont.).

## 6. CONCLUSÕES

O método de ultrasonicação nas condições dos ensaios mostrou-se sensível na extração de mutágenos presentes nas 18 amostras de material particulado de ar analisadas, sendo portanto eficiente o seu uso para essa finalidade.

O Teste de Ames, nas condições testadas, se mostrou adequado na detecção de mutágenos presentes em amostras de material particulado de ar, podendo se constituir em um instrumento muito útil no monitoramento e avaliação da qualidade do ar.

Apesar do pequeno número de amostras testadas neste estudo, cujo objetivo foi a avaliação da metodologia de extração, a presença de atividade mutagênica detectada em todas as amostras analisadas, revela a necessidade do desenvolvimento de estudos em diversas áreas da região de São Paulo e Cubatão com o objetivo de fornecer subsídios para a área de controle da poluição do ar, em relação a distribuição de compostos com atividade mutagênica principalmente em áreas críticas.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- ALFHEIM, I. & MOLLER, M. Mutagenicity of long -range transported atmospheric aerosols. Sci. Total Environ. 13: 275 - 278, 1979.
- ALINK, G.M.; SMITH, H.A.; VAN HOUTT, J.J.; KOLKMAN, J.R. & BOLEIJ, J.S.M. Mutagenicity activity of airborne particulates at non industrial locations. Mutat. Res., 116: 21 - 34, 1983.
- AMES, B.N.; MCCANN, J. & YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. Mutat. Res., 31: 347 - 363, 1975.
- AULETA, A. & ASHBY, J. Workshop on the relationship between short-term test information and carcinogenicity Williamsburg, Vg, Jan 20-23/87. Environment Molecular Mutagenesis, 11: 135-145, 1988.
- AVERY, M.J.; RICHARD, J.J. & JUNK, G.A. Simplified determination of polycyclic aromatic hydrocarbons. Talanta, 31: 49-53, 1983.
- BRUSICK, D.J. & MAYER, W. New developments in mutagenicity screening techniques with yeast. Environ. Health Perspect., 6: 83 - 96, 1973
- CETESB, São Paulo. Qualidade do ar na região metropolitana de São Paulo e em Cubatão - 1986. São Paulo, 1987, 186 p.
- CHRISP, C.E. & FISHER, G.L. Mutagenicity of airborne particles. Mutat. Res. 76: 143 - 164, 1980.
- COURTOIS, Y. Genotoxicité des particulates atmospheriques en suspension en zone urbaine. Tese de Doutorameto, Université de Paris (R. Descartes), 1984, 107 p.

DAISEY, J.M.; & LEYKO, M.A. The nature of the organic fraction of the New York city summer aerosol. Ann. N.Y. Acad.Sci., 322: 125 - 141, 1979.

DAISEY, J.M.; KNEIP, T.; HAWRYLUK, I & MUKAI, F. Seasonal variation in the bacterial mutagenicity of airborne particulate organic matter in New York City. Am. Chem. Soc., 14: 1487 - 1490, 1980.

DAISEY, J.M.; MORANDI, M. & LIOY, P.J. Regional and local influences on the nature of organic matter at four sites in New Jersey during summer, 1981. Atmos. Environ., 18 (7): 1411 - 1419, 1984.

DE MARINI, D.M. The mutagenicity of cigarette smoke condensate in Saccharomyces cerevisiae. Mutat. Res., 53: 84, 1979.

DE RAAT, W.K. Genotoxicity of aerosol extracts - Some methodological aspects and the contribution of urban and industrial locations. Mutat. Res., 116: 47 - 63, 1983.

DUNKEL, V.C.; ZEIGER, E.; BRUSICK, D.; Mc COY, E.; Mc GREGOR, D.; MORTELMANS, K.; ROSENKRANZ, H.S. & SIMMON, V.F. Reproducibility of Microbial Mutagenicity assays. II. Testing of carcinogens and non carcinogens in Salmonella typhimurium and E. coli. Environ. Mutag., 7 (S5): 1 - 52, 1985.

GOLDEN, C. & SAWICKI, E. Determination of benzo [ a ] pyrene and other polynuclear aromatic hydrocarbons in airborne particulate material by ultrasonic extraction and reverse phase high pressure liquid chromatography. Anal. Letters, A11 (2): 1051 - 1062, 1978.

GROSJEAN, D. Solvent extraction and organic carbon determination in atmospheric particulate matter: The organic extraction-organic carbon analyser (OE - OCA) technique. Anal. Chem., 47: 797 - 805, 1975.

- HITOSUGI, M. Epidemiological study of lung cancer with special reference to the effect of air pollution and smoking habits. Inst. Public Health Bull., 17: 237- 256, 1968.
- HUGHES, T.J.; PELLIZZARI, E.; LITTE, L.; SPARACINO, C. & KOLBER, A. Ambient air pollutants: Collection chemical characterization and mutagenicity tests. Mutat. Res., 76: 51-83, 1980.
- HUISINGH, J.L.; BRADOW, R.L.; JUNGERS, R.H.; HARRIS, B.D.; ZWEIDINGER, R.B.; CUSHING, K.M.; GILL, B.E. & ALBERT, R.E. Mutagenic and carcinogenic potency of extracts of diesel and related environmental emissions: study design, sample generation, collection and preparation. Proceedings: Health Effects of Diesel Engine Emissions. V.2., Cincinnati, Dec, 3-5, 1979. Springfield, EPA, 1980. p. 788-800. (EPA 600/9-80-057b).
- KRISHNA, G.; ONG, T.; WHONG, W.Z. & NATH, J. Mutagenicity studies of ambient airborne particle. I Comparison of solvent systems. Mutat. Res., 124: 113-120, 1983a.
- KRISHNA, G.; NATH, J.; WHONG, W.Z. & ONG, T. Mutagenicity studies of ambient airborne particle II. Comparison of extraction methods. Mutat. Res., 124: 121-128, 1983b.
- LEITER, J.; SHIMKIN, M.B. & SHEAR, M.J. Production of subcutaneous sarcomas in mice with tars extracted from atmospheric dusts. J. Natl. Cancer Inst., 3: 155-165, 1942.
- LOPER, J. Mutagenic effects of organic compounds in drinking water. Mutat. Res., 76: 241 - 246, 1980.
- LOUIS, J.B.; ALTHERHOLT, T.B.; DAISEY, J.M.; Mc GEROGUE, L.J. & Mc GARRITY, G.J. Mutagenicity of inhalable particle matter at four sites in New Jersey. In: LLOYD, P.J. & DAISEY, J.M., ed. Toxic Air Pollutants - A comprehensive study of non criteria air pollutants. U.S.A., Lewis, 1987. p. 124-166.

- MARON, D.M. & AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test Mutat. Res., 113: 173 - 215, 1983.
- Mc CANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E. & AMES, B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/ microsome test: Assay of 300 chemicals. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 72: 5135 - 5139, 1975.
- Mc GEORGE, L.S.; LOUIS, J.B.; ALTHERHOLT, T.B. & Mc GARRITY, 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.; STRAUSS, G. & NESNOW, S., ed. Short term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures. U.S.A., Plenum. v.4., 1985. p. 247 - 267.
- MORTELMANS, K.; HAWORTH, S.; LAWLOR, T.; SPECK, W.; TAINER, B. & ZEIGER, E. Salmonella mutagenicity tests: II Results from the testing of 270 chemicals Environ. Mutagen., 8 (S7): 1 - 39, 1986.
- NEAL, M.W.; MASON Jr., L.; SCHWARTZ, D.J. & SAXENA, J. Assessment of mutagenic potential of mixtures of organic substances in renovated water. Cincinnati, EPA, 1981 (EPA 600-51-81-016- S.R.C. TR80-052).
- PITTS JR, J.N. 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.
- PITTS JR, J.N.; GROSJEAN, D.; MISCHKE, T.M., SIMON, V.F. & POOLE, D. Mutagenic activity of airborne particulate organic pollutants. Toxicol. Letters, 1: 65 - 70, 1977.
- PURCHASE, I; LONGSTAFF, E.; ASHBY, J.; STYLES, J.; ANDERSON, D.; LEFREVE, P. & WESTWOOD, R. An evaluation of six short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. Br. J. Cancer, 37: 873-903, 1978.

- RINKUS, S. & LEGATOR, M. The need for both in vitro systems in mutagenicity screening. In: DE SERRES, F. & HOLLAENDER, A. , ed. Chemical Mutagens: Principles and Methods for their detection. New York, Plenum, 1980. p. 4196 - 4203.
- SANCHEZ, P.S.; SATO, M.I.Z.; PASCHOAL, C.M.R.B.; ALVES, M.N.; FURLAN, E.V. & MARTINS, M.T. Toxicity assessment of industrial effluents from São Paulo State, Brazil, using short term microbial assays. Toxic. Assess., 3: 55- 80 , 1988.
- SASAKI, Y.; ENDO, R.; IZUMIKAWA, S.; WATANABE, T.; ONOZUKA, H.; SUGA, K.; ISE, H. & ASAKUNO, K. Mutagenic activity of airborne particulates. Mutat. Res., 164: 279, 1986.
- SEEMAYER, N.H.; SCHÜRER, C.C.; KÖNIG, H. & MANOJLOVIC, N. Mutagenicity of airborne particulate pollutants: induction of point mutations and sister-chromatid exchanges in tissue culture cells. Mutat. Res., 147: 134, 1985.
- TAKEDA, N.; TERANISHI, K. & HAMADA, K. Mutagenicity of air pollutants collected at industrial urban-residential and rural areas. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 32: 688 - 692, 1984.
- TALCOTT, R. & HARGER, W. Airborne mutagens extracted from particles of respirable size. Mutat. Res., 79: 177- 180, 1980.
- TENNANT, R.W.; MARGOLIN, B.H.; SHELBY, M.D.; ZEIGER, E.; HASEMAN, J.K.; SPALDING, J.; CASPARY, W.; RESNICK, M.; STASIEWICZ, S.; ANDERSON, B. & MINOR, R. Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. Science, 236: 933-941, 1987.
- TOKIWA, H.; MORITA, K.; TAKEYOSHI, H.; TAKAHASHI, K. & OHNISHI, Y. Detection of mutagenic activity in particulate air pollutants. Mutat. Res., 48: 237 - 248, 1977.

VIAU, C.J.; SHERMAN, S. M. & SABHARWAL, P. S. Comparative extraction of genotoxic components of air particulate with several solvents systems. Mutat. Res., 105: 133-137, 1982.

WHO. Selected methods of measuring air pollutants. Geneva, WHO, 1976. 112p. (WHO OFFSET PUBLICATION N° 24).

Data Aquis.:	13/4/89
Indic.:	<del>doença</del> NABM
Livraria:	
Preço:	US
Data Tombo:	13/4/89