

CETESB

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

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

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

APLICAÇÃO DE BIOENSAIOS MICROBIANOS
NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DE POLUENTES ATMOSFÉRICOS. MATE
RIAL PARTICULADO DE AR.

PROJETO 58.03.00

São Paulo
Janeiro/1992

CLASS.	
AUT.	
TOMBO	30945

8302
Sa83a(RCET)
030945

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO

Luiz Antonio Fleury Filho

Governador

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE

Édis Milaré

Secretário

CETESB

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

Walter Lazzarini

Diretor-Presidente

Antonio Martins de Albuquerque

Diretor de Normas e Padrões Ambientais

Carlos Pedro Jens

Diretor de Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologia

Lineu Rodrigues Alonso

Diretor de Controle da Poluição de Regiões Metropolitanas

Luiz Antonio Ercolin

Diretor de Treinamento e Transferência de Tecnologia

Ricardo Augusto Grecco Teixeira

Diretor Administrativo e Financeiro

Walter Godoy dos Santos

Diretor de Controle da Poluição do Interior

CETESB

FICHA TÉCNICA BIBLIOGRÁFICA

DOCUMENTO

TIPO

Relatório Técnico

DATA

Agosto

1992

ORIGEM

NABM

Nº PÁGINA/V.

20 + anexos

Nº MAFAS

0

TÍTULO DO DOCUMENTO

Aplicação de Bioensaios Microbianos na Avaliação da
Atividade Mutagênica de Poluentes Atmosféricos.
Material Particulado de Ar.

AUTOR RESPONSÁVEL

ASSINATURA / CARIMBO / DATA

AUTORES/ENTIDADES OU UNIDADES A QUE PERTENCEM

Petra S. Sanchez

NAB

Maria Inês Zanolli Sato

NABM

Gisela Umbuzeiro Valent

NABM

Maria Cristina L. S. Coelho

NABM

Carlos Alberto Coimbra

NABM

Paulo Fernando Rodrigues

NABM

DOCUMENTO AUTORIZADO POR

ASSINATURA / CARIMBO / DATA

DOCUMENTO REVISADO

ASSINATURA / CARIMBO / DATA

CLASSIFICAÇÃO DE SEGURANÇA

☐ EXTERNA

☐ INTERNA

☐ RESERVADA

PALAVRAS CHAVES

Material particulado de Ar; Atividade Mutagênica; Teste de Ames; Microensaio
de Mutação Direta; Simulteste.

CÓDIGO E TÍTULO DO PROJETO

58.03.00

Aplicação de Bioensaios Microbianos na Avaliação da Atividade
Mutagênica de Poluentes Atmosféricos.
Material Particulado de Ar.

DISTRIBUIÇÃO INTERNA

ÁREAS/Nº DE CÓPIAS

NABM

USO DA BIBLIOTECA

CLASSIFICAÇÃO DE ASSUNTO

Nº DOCUMENTO

VISTO / CARIMBO / DATA

RESUMO

Neste trabalho foram avaliados bioensaios rápidos para detecção de atividade mutagênica em amostras de extratos orgânicos de material particulado de ar, procedentes do Parque Dom Pedro II, São Paulo.

As amostras foram coletadas através de filtros Hi-vol, e a extração orgânica foi feita pelo método de ultrassonicação. O material orgânico obtido foi testado frente a três bioensaios microbianos: o Teste de Ames com a cepa de *S. typhimurium* TA98, o Microensaio de Mutação Direta (*Salmonella* Microforward Assay) com a cepa de *S. Typhimurium* TM677 e o Simulteste ("Simultest") com as cepas TA98, TA100, TA104 e TA97a. Nos dois primeiros bioensaios as amostras foram testadas com e sem fração S9, no Simulteste os ensaios foram feitos sem ativação metabólica.

Para o Teste de Ames e para o Microensaio de Mutação Direta foram feitas curvas dose resposta utilizando-se diferentes concentrações de material particulado de ar, enquanto no Simulteste foi empregada uma única dose teste. Os resultados de cada bioensaio foram comparados entre si, com o objetivo de se avaliar a aplicabilidade desses testes para complementação da avaliação da qualidade do ar do estado de São Paulo.

O Teste de Ames conforme trabalhos anteriores realizados no Setor de Microbiologia da CETESB se mostrou adequado na detecção de mutágenos presentes em material particulado de ar.

Os outros dois bioensaios utilizados também foram capazes de detectar mutagenicidade nas amostras testadas. No entanto estudos adicionais devem ser feitos com o Microensaio de Mutação direta com a finalidade de aumentar a sua sensibilidade, e em relação ao Simulteste o estabelecimento de metodologia adequada para a sua utilização com fração S9.

OBSERVAÇÕES

USO DA BIBLIOTECA

LOCAL

EDITORA

IDIOMA

PORTUGUÊS ☐

INGLÊS ☐

ESPAÑHOL ☐

FRANCÊS ☐

ALEMÃO ☐

ITALIANO ☐

SÉRIE

Coordenador do Projeto:

Petra S. Sanchez

Equipe Técnica:

Maria Inês Zanolli Sato

Gisela Umbuzeiro Valent

Maria Cristina L.S. Coelho

Carlos Alberto Coimbra

Paulo Fernando Rodrigues

SUMÁRIO

	Pág.
1. OBJETIVOS.....	1
2. INTRODUÇÃO.....	2
3. ANÁLISE DA LITERATURA.....	3
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
4.1. Amostragem.....	7
4.2. Preparo da Amostra.....	7
4.2.1. Extração por ultrasonicação.....	7
4.3. Procedimento das análises.....	8
4.3.1. Teste de Ames.....	8
a) Método do Ensaio.....	8
b) Expressão e Interpretação dos Resultados.....	9
4.3.2. Microensaio de Mutação Direta	10
a) Método do Ensaio.....	10
b) Expressão e Interpretação dos Resultados.....	11
4.3.3. Simulteste	12
a) Método do Ensaio.....	12
b) Expressão e Interpretação dos Resultados.....	13
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
5.1. Teste de Ames.....	14
5.2. Microensaio de Mutação Direta.....	14
5.4. Simulteste.....	15
6. CONCLUSÕES.....	16
7. BIBLIOGRAFIA	17

ANEXOS

ANEXO A - Tabelas 1 a 3

ANEXO B - Figuras 1 a 3

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Comparação entre o Teste de Ames e o Microensaio de Mutação Direta para o extrato orgânico da amostra PDP 395..... 24
- FIGURA 2 - Comparação entre o Teste de Ames e o Microensaio de Mutação Direta para o extrato orgânico da amostra PDP 408 25
- FIGURA 3 - Comparação entre o Teste de Ames e o Microensaio de Mutação Direta para o extrato orgânico da amostra PDP 415..... 26

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Resultados dos diferentes ensaios realizados para as amostras de material particulados de ar..... 21
- TABELA 2 - Resultados do Teste de Ames e do Microensaio de Mutação Direta expressos em m^3 equivalente..... 22
- TABELA 3 - Comparação entre o Teste de Ames e o Microensaio de Mutação Direta através da concentração mínima efetiva (CME) expressa em μg 23

RESUMO

Neste trabalho foram avaliados bioensaios rápidos para detecção de atividade mutagênica em amostras de extratos orgânicos de material particulado de ar, procedentes do Parque Dom Pedro II, São Paulo.

As amostras foram coletadas através de filtros Hi-vol, e a extração orgânica foi feita pelo método de ultrassonicação. O material orgânico obtido foi testado frente à três bioensaios microbianos: o Teste de Ames com a cepa de *S. typhimurium* TA98, o Microensaio de Mutação Direta (*Salmonella* Microforward Assay) com a cepa de *S. typhimurim* TM677 e o Simulteste ("Simultest") com as cepas TA98, TA100, TA104 e TA97a. Nos dois primeiros bioensaios as amostras foram testadas com e sem fração S9, no Simulteste os ensaios foram feitos sem ativação metabólica.

Para o Teste de Ames e para o Microensaio de Mutação Direta foram feitas curvas dose-resposta utilizando-se diferentes concentrações de material particulado de ar, enquanto no Simulteste foi empregada uma única dose teste. Os resultados de cada bioensaio foram comparados entre si, com o objetivo de se avaliar a aplicabilidade desses testes para complementação da avaliação da qualidade do ar do estado de São Paulo.

O Teste de Ames conforme trabalhos anteriores realizados no Setor de Microbiologia da CETESB se mostrou adequado na detecção de mutágenos presentes em material particulado de ar.

Os outros dois bioensaios utilizados também foram capazes de detectar mutagenicidade nas amostras testadas. No entanto, estudos adicionais devem ser feitos com o Microensaio de Mutação Direta com a finalidade de aumentar a sua sensibilidade, e em relação ao Simulteste o estabelecimento de metodologia adequada a sua utilização com fração S9.

1. OBJETIVOS:

Avaliar novos bioensaios rápidos para detecção de atividade mutagênica em amostras de extratos orgânicos de material particulado de ar, visando fornecer metodologias analíticas para utilização em futuros programas de controle da poluição do ar.

2. INTRODUÇÃO

Recentemente a pesquisa de compostos mutagênicos em amostras ambientais vem adquirindo grande importância em consequência dos possíveis efeitos adversos à saúde 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 empreendidos 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.

3. ANÁLISE DA LITERATURA

As amostras atmosféricas são consideradas misturas complexas pois podem conter centenas de compostos diferentes na forma de gases e material particulado, tanto de origem natural (poeira, vegetação) como de origem antropogênica (emissões de veículos, fumaça, etc.) (HUGHES et alii, 1980).

As partículas atmosféricas finas ($<2,5 \mu\text{m}$) são as que desempenham papel mais importante com relação a saúde pois penetram profundamente no sistema respiratório (CETESB, 1987) e são nessas partículas que a maior parte dos compostos mutagênicos se associam (TALCOTT & HARGER, 1980).

As amostras de material particulado de ar devem ser submetidas a processos de extração orgânica antes de serem testadas frente a ensaios microbianos. O método de ultrassonicação tem-se mostrado o mais eficiente na recuperação de compostos mutagênicos, conforme estudos comparativos realizados por GOLDEN & SAWIKI (1978) e KRISHNA et alii (1983b) e tem sido utilizado por vários autores tais como PITTS et alii (1982); VIAU et alii (1982); AVERY et alii (1983), COURTOIS (1984). Além disso, resultados obtidos em projeto conduzido anteriormente pela Divisão de Análises Microbiológicas (CETESB, 1989) confirmaram estes resultados.

Após a extração das amostras, a detecção de compostos com atividade genotóxica nos extratos de material particulado de ar pode ser realizada por métodos químicos ou medindo-se diretamente sua atividade através de bioensaios.

Os ensaios "in vitro" empregando microrganismos tem sido os mais utilizados devido a sua praticidade e baixo custo quando comparados com testes "in vivo" com mamíferos ou com análises químicas utilizando espectrômetros de massa e cromatógrafos.

Dentre os vários bioensaios microbianos empregados na avaliação de material particulado de ar, o Teste de Ames (*Salmonella/mammalian microsome mutagenicity assay*) descrito por Ames et alii em 1975 e revisado por Maron & Ames em 1983 tem sido o mais utilizado.

Segundo CHRISP & FISHER (1980) as amostras de material particulado tem demonstrado conter tanto mutágenos diretos como indiretos, fazendo-se portanto necessário o uso de enzimas microssomais de mamíferos (WRIGHT, 1980) acoplados aos ensaios microbianos, tendo em vista que os microrganismos são incapazes de fazer essa etapa de metabolização. O sistema de metabolização mais comumente utilizado é o homogenado de fígado de roedores após indução com bifenilas policloradas (PCBs).

TOKIWA et alii (1977) estudaram 6 diferentes pontos na área industrial de Ohmuta e residencial de Fukuoka no Japão, através do teste de Ames. Todas as amostras apresentaram atividade mutagênica, sendo que as da área industrial foram muito mais mutagênicas que as da área residencial.

DAISEY et alii (1980) observaram as variações sazonais da atividade mutagênica através do Teste de Ames, em amostras de material particulado de ar, da cidade de New York e durante o inverno foi observado a máxima atividade mutagênica.

MOLLER & ALFHEIM (1982), estudando atividade mutagênica através do teste de Ames de amostras coletadas nas ruas de Oslo (Noruega), mostraram que a atividade mutagênica variava com a intensidade do tráfico e que estava associada aos compostos policíclicos aromáticos.

COURTOIS (1984), analisando material particulado coletado no centro da cidade de Paris, utilizando o teste de Ames observou

que a genotoxicidade era maior quando se incluía sistema de metabolização (fração S9). Os valores da concentração mínima efetiva (CME) obtidos para o teste de Ames foram expressos em revertentes/m³ e variaram de 4 a 100 para TA98.

ATHANASIOU et alii (1986) coletaram amostras de material particulado da cidade de Atenas, Grécia, e através dos resultados do teste de Ames e análises químicas concluíram que a concentração dos mutágenos era mais alta em áreas com tráfego intenso que nas áreas industriais.

SASAKI et alii (1986) analisaram a atividade mutagênica através do Teste de Ames de 12 diferentes locais em Tóquio e concluíram que a mutagenicidade era maior nas áreas urbanas que em áreas rurais.

Outros ensaios tem sido também utilizados, porém com menor frequência como é o caso do Microensaio de Mutação Direta ("Salmonella Microforward Assay") (LEWTAS et alii, 1987), e do Simulteste ("Simultest") (McPHERSON & NESTMANN, 1990). O primeiro é uma modificação do ensaio descrito por SKOPECK et alii (1978) e o segundo, é uma modificação do Teste de Flutuação inicialmente descrito por GREEN et alii (1976).

Segundo os trabalhos de GREEN et alii (1976) e NESTMANN et alii (1981), o Teste de Flutuação tem se mostrado útil principalmente na detecção de mutágenos fracos. Recentemente, este ensaio foi modificado por McPHERSON & NESTMANN (1990) permitindo a utilização de várias cepas de "Salmonella typhimurium" do Teste de Ames convencionais combinadas. O resultado desta estratégia é que se utiliza no mínimo quatro vezes menos material do que no Teste de Ames.

SORENSEN et alii (1982), utilizando o Teste de Ames e o Teste de Flutuação com a cepa TA 98 verificaram que para os dois ensaios a

mutagenicidade era maior nas partículas menores que 2 μ m. Os dois ensaios apresentaram uma boa correlação, no entanto houve uma vantagem de 8,1% na frequência de amostras positivas para o Teste de Ames.

LEWTAS et alii (1987), utilizaram o Teste de Ames e o Microensaio de Mutação Direta ("Salmonella Microforward Assay") para analisar a mutagenicidade de material particulado de ar gerado em oito residências pela combustão de gás natural utilizado para aquecimento. Os dois ensaios detectaram atividade mutagênica em todas as amostras, no entanto, a quantidade de material utilizado para produzir resposta no "Microforward" foi bem menor que a necessária para o Teste de Ames. Estes resultados demonstraram a utilidade do "Microforward" nos casos em que a quantidade de material disponível é muito pequena.

Considerando-se que a quantidade de material extraído muitas vezes é inferior a necessária para a realização do Teste de Ames, ensaios que empregam quantidade menor de material como o Microensaio de Mutação Direta (Salmonella Microforward Assay) e o Simulteste ("Simultest") se tornam alternativas viáveis para avaliação da genotoxicidade de amostras ambientais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

Foram analisadas quanto ao potencial mutagênico 3 amostras de material particulado de ar coletadas no Parque Dom Pedro II (PDP), São Paulo - Vale do Rio Tamanduateí, próximo à um terminal de ônibus urbanos e corredores de tráfego com veículos pesados. A coleta foi feita em filtros de fibra de vidro GELMAN A/E e amostradores de ar Hi-vol por 24 horas e vazão média de 2000 m³ de ar. Os filtros foram pesados antes e depois da amostragem após equilíbrio a 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

4.2.1. Extração por ultrasonicação

O método utilizado se baseia nos trabalhos descritos por PITTS et alii (1982) e COURTOIS (1984). Metade de cada filtro foi ultrassonicado por 10 minutos submerso em 100 mL de mistura de solventes (metanol e diclorometano 1:1). O extrato foi retirado e a amostra submetida a novo processo de extração nas mesmas condições. Os extratos obtidos foram combinados e filtrados em membrana de fibra 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 dimetilsulfóxido (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. 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 ug de material orgânico extraído (MOE).

4.3. Procedimento das análises

4.3.1. Teste de Ames (*Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity assay)

a) Método de Ensaio

Este ensaio utiliza cepas de *Salmonella* auxotróficas para histidina que tem capacidade de detectar mutações de ponto. Neste estudo empregou-se a cepa TA 98 que detecta mutação por deslocamento do quadro de leitura do DNA; a escolha desta cepa baseou-se no critério adotado por HUGHES et alii (1980). Durante toda a execução das análises a cepa foi testada quanto às suas características genéticas e taxa de reversão espontânea. Os experimentos foram realizados segundo método de incorporação em placas conforme MARON & AMES (1983), com e sem ativação metabólica, utilizando-se microsossomos de células de fígado de rato induzido com AROCLOR 1254-Fração S9 (Organon Teknica Corporation - USA).

O ensaio consistiu na mistura de 100 uL de diferentes diluições da amostra, 100 uL de cultura (aproximadamente 10^8 células) e 500 uL de mistura S9, (para o ensaio com ativação metabólica) em tubos contendo 2 mL de top agar estabilizados à 45°C.

Após homogeneização a mistura foi vertida em placas de agar

mínimo, as quais foram incubadas por 48 horas à 35°C. A seguir procedeu-se a contagem do número de colônias revertentes crescidas nas placas controle e nas placas teste. O número de revertentes induzidas é função da concentração e da potência dos agentes mutagênicos presentes na amostra.

Foram testadas 5 doses de cada extrato e a dose máxima de exposição foi 500 ug de MOE por placa, seguida de 250, 100, 50 e 10 ug.

Foram realizados controles positivos utilizando-se 0,5 ug por placa de 4-nitro-quinoline-1-óxido na ausência de fração S9 e de 2,5 ug de 2-antramine por placa na presença de fração S9. O ensaio foi realizado em triplicata.

b) Expressão e Interpretação dos Resultados

Foi calculado a média de revertentes por placa em cada dose testada e a razão de mutagenicidade (RM), que é a média do número de colônias revertentes na placa teste (revertentes espontâneas e os induzidos) e pelo número de colônias na placa controle (revertentes espontâneas).

Os dados foram submetidos a análise estatística segundo MYERS et alli (1987) utilizando-se um programa denominado Salmonel. A saída do programa informa o número de revertentes por ug de MOE ou m³ de ar equivalentes baseado no melhor modelo matemático de regressão linear testado. A partir da reta de regressão linear também foi calculado o CME que é a menor concentração capaz de induzir uma resposta positiva para cada cepa testada, e pode ser expresso em ug de MOE ou m³ equivalente de ar.

Considerou-se uma amostra positiva quando foi observado uma relação de dose resposta entre as doses testadas e o número de revertentes por placa e quando a razão de mutagenicidade foi igual ou superior à 2,0. Quando somente um dos critérios foi atingido considerou-se que a amostra apresentou indícios de mutagenicidade. Esse critério de interpretação de resultados foi baseado no adotado por McGEORGE et alii (1985).

Para efeito de comparação entre o Teste de Ames e o Microensaio de Mutação Direta foi feita também uma regressão linear com os valores de razões de mutagenicidade e as respectivas doses testadas.

4.3.2. Microensaio de Mutação Direta (Salmonella Microforward Assay)

a) Método de Ensaio

Este microensaio é uma modificação do teste de mutação direta proposto por SKOPECK et alii em 1978. Consiste na utilização da cepa de *S. typhimurium* TM677 capaz de formar colônias resistentes à 8-azaguanina (8-AG) quando sofre mutação direta. A resistência à 8-AG é resultado da perda de atividade da enzima xantina fosforibosil transferase, responsável pelo transporte e fosforibosilação da 8-AG na membrana celular. O produto dessa reação inicial é um nucleotídeo que em seguida é metabolizado e incorporado aos ácidos nucleicos, onde exerce sua ação tóxica sobre a bactéria.

A resistência à 8-AG poderia ser resultado tanto de uma

substituição de pares de bases quanto de deslocamento do quadro de leitura do DNA nos genes estruturais ou reguladores da xantina fosforibosil transferase; desta forma uma única cepa é capaz de detectar os dois eventos.

A metodologia empregada neste trabalho, foi descrita por LEWTAS et alii em 1987 e consistiu na pré-incubação por 1 hora à 35°C sob agitação 5 uL de diferentes doses da amostra adicionados a uma solução contendo a cepa em meio mínimo E, no ensaio sem ativação metabólica. Para o ensaio com ativação metabólica adiciona-se também cofatores e fração S9. Após a pré-incubação, foi feito o plaqueamento para determinação de colônias mutantes e sobreviventes. Para o primeiro caso, foram adicionados 100 uL da mistura tratada a 10 mL de TOP AGAR contendo o agente seletivo (8 AG), distribuindo-se a seguir, 2,5 mL por placa de agar mínimo. Para a determinação de colônias sobreviventes foram feitas diluições seriadas de até 10^{-8} , sendo a última em 10 mL de TOP AGAR não seletivo e deste distribuídos também 2,5 mL em placas de agar mínimo. Os dois plaqueamentos foram feitos em triplicata. Após incubação à 35°C por 48 horas procedeu-se a leitura.

Foram testadas 5 doses de cada extrato, sendo que a máxima foi de 400 ug de MOE por tubo e a mínima de 2 ug.

Foram realizados controles positivos utilizando-se 0,5 ug de 4-nitro-quinolina-1-óxido e 10 ug de benzo-a-pireno por tubo na ausência e presença de ativação metabólica respectivamente.

b) Interpretação e Expressão dos Resultados

Após o cálculo da média de mutantes e sobreviventes para cada dose testada foi calculada a frequência de mutação, que é a razão entre a média de mutantes e a de sobreviventes multiplicada pelo

fator de diluição utilizado. Os resultados obtidos foram expressos como frequência de mutação em 10^6 sobreviventes para cada dose, sendo realizada em seguida uma regressão linear com estes valores, onde a inclinação da reta obtida indica a potência da amostra testada.

Para comparação com o Teste de Ames foi também calculada a razão de mutagenicidade (RM) e o CME, conforme descrito no item 4.3.1b.

4.3.3. Simulteste ("Simultest")

a) Método de Ensaio

O Simulteste, ensaio proposto por MCPHERSON & NESTMANN (1990), tem como base a utilização de diferentes cepas de *S. typhimurium* do Teste de Ames misturadas, testando assim a resposta de várias cepas simultaneamente.

O ensaio é realizado em microplaca de 96 orifícios e tem como base o mesmo princípio do Teste de Flutuação desenvolvido inicialmente por GREEN et alii (1976) em tubo de ensaio e mais tarde adaptado por GATEHOUSE et alii (1978) para microplaca.

O teste consistiu basicamente na adição de volumes iguais num total de 100 μ L de cultura overnight das cepas de *S. typhimurium* de TA 98, TA 100, TA 97a e TA 104 a 20 mL de meio mínimo contendo como indicador de pH o púrpura de bromocresol, a essa solução foram adicionados 200 μ L da amostra a ser testada. Em seguida, 200 μ L da mistura foram dosados em cada um dos 96 orifícios de uma microplaca. As microplacas foram incubadas à 35°C por 72 horas. Ao final do período de incubação foram contados somente os

orifícios que apresentaram crescimento bacteriano, indicado pela cor amarela. O ensaio foi realizado sem ativação metabólica.

Neste trabalho, foi utilizada somente a dose de 25 ug de MOE/ mL para avaliação do ensaio.

Foram empregados como controles positivos a 4-nitro-quinolina-1-óxido e a azida sódica nas doses de 0,1 e 0,2 ug/ mL, respectivamente.

b) Interpretação e Expressão dos Resultados

Para comparação entre o número de orifícios positivos obtidos no controle negativo e para a amostra testada foi utilizado o teste de χ^2 . Considerou-se significativos valores de $\chi^2 > 3,84$ ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste de Ames

As três amostras testadas apresentaram atividade mutagênica neste ensaio. Os resultados foram expressos em número de revertentes por μg de material orgânico extraído (MOE) (Tabela 1) e em número de revertentes por m^3 equivalente de ar (Tabela 2). Os valores de revertentes por m^3 de ar equivalente variaram de 11,44 a 118,59, estes valores foram semelhantes aos obtidos por COURTOIS (1985) em amostras do centro de Paris.

O Teste de Ames se mostrou adequado na avaliação da mutagenicidade de amostras de material particulado de ar, porém para que possa ser aplicado são necessários no mínimo 11 mg de material orgânico extraído por m^3 de amostra, segundo relatório CETESB, 1989.

5.2 Microensaio de Mutação Direta (Salmonella Microforward Assay)

Os resultados do Microensaio de Mutação Direta foram expressos em número de mutantes por μg de MOE ($\times 10^{-3}$), e em número de mutantes por m^3 equivalente ($\times 10^{-3}$), apresentados nas Tabelas 1 e 2 respectivamente. Somente a amostra de novembro/ 1989 foi positiva com e sem fração S9, a amostra de janeiro/1990 apresentou atividade somente na presença de ativação metabólica e a de outubro/1989 foi negativa, correspondendo a amostra menos potente no Teste de Ames.

Para comparação com o Teste de Ames foi calculada a concentração

mínima efetiva (CME). Os valores de CME para este ensaio variaram de 95,52 a 219,70 ug. Esses valores estão na mesma faixa dos obtidos para o Teste de Ames.

Uma outra forma para compararmos com o Teste de Ames é utilizar a razão de mutagenicidade (RM), este critério foi utilizado por Lewtas et alii (1987). Os valores de RM plotados nas figuras 1 a 3, indicam respostas semelhantes para os dois testes.

No entanto, durante a execução deste ensaio, foi observado que o número de células sobreviventes no controle negativo estava abaixo do recomendado, o que resultaria numa menor sensibilidade do teste, sugerindo algumas modificações em sua metodologia.

Em relação a quantidade de material (MOE) utilizada neste ensaio, esta foi superior a empregada no Teste de Ames, observação oposta foi feita por Lewtas et alii, 1987.

5.3 Simulteste ("Simultest")

Como no Teste de Ames as três amostras testadas apresentaram atividade mutagênica frente ao Simulteste. Este resultado era esperado, pois uma das linhagens de *Salmonella typhimurium* empregadas neste ensaio foi a TA98, a mesma utilizada para análise no Teste de Ames. Neste trabalho foi empregada uma única dose e portanto o resultado foi qualitativo.

O ensaio foi feito na ausência de fração S9, pois as condições de análise na presença de metabolização ainda estão sendo estabelecidas pelos autores (McPHERSON & NESTMANN, 1990).

6. CONCLUSÕES

O Teste de Ames, conforme resultados obtidos anteriormente por projetos conduzidos pelo Setor de Análises Microbiológicas (CETESB, 1989; CETESB; 1990) se mostrou adequado na detecção de mutágenos presentes nas amostras de material particulado de ar.

Apesar do pequeno número de amostras testadas podemos sugerir em relação aos outros ensaios:

O Microensaio de Mutação Direta apresentou sensibilidade semelhante ao Teste de Ames, contudo, consideramos que a resolução de alguns problemas de metodologia poderia otimizar a sensibilidade deste ensaio.

O Simulteste se mostrou adequado na avaliação de mutagenicidade de amostras de material particulado de ar, apresentando a vantagem de poder ser aplicado mesmo quando houver pouco material disponível. No entanto, até o momento só pode ser utilizado sem fração S9, pois a metodologia de ensaio nessa condição ainda não foi desenvolvida.

BIBLIOGRAFIA

- .. ATHANASIOU, K.; VIRAS, L.G. & SISKOS, P.A. Mutagenecity and polycyclic aromatic hydrocarbons analyses of ambient airborne particles collected in Athens,, Greece. *Sci. Total Environ.*, 52: 201-209, 1986.
- .. AVERY, M.J.; RICHARD, J.J. & JUNK, G.A. Simplified determination of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Talanta*, 31: 49-53, 1983.
- .. CETESB, São Paulo. Qualidade do ar na região metropolitana de São Paulo e em Cubatão - 1986, São Paulo, 1987, 186 p.
- .. CETESB, São Paulo. Avaliação de testes rápidos de mutagenicidade para caracterização de amostras de ar (material particulado), São Paulo, 1989, 51p.
- .. CETESB, São Paulo. Avaliação de testes rápidos de mutagenicidade para caracterização de amostras de ar (material particulado), São Paulo, 1990, 40p.
- .. CHRISP, C.E. & FISHER, G.L. Mutagenicity of airborne particles. *Mutat. Res.*, 26: 143-164, 1980.
- .. COURTOIS, Y. Genotoxicité des particulates atmospheriques en suspension en zone urbaine. Tese de Doutorado, Université de Paris (R. Descartes), 1984, 107 p.
- .. 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.

- .. EPA, USA. Quality control and quality assurance procedures for level 1 - Health effects bioassays, Washington, EPA, 1983. p.24 (EPA 600/8-83-034).

- .. GOLDEN, C. & SAWICK, 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, 11 (2): 1051-1062, 1978.

- .. GREEN, M.H.L.,; MURIEL, W.J. & BRIDGES, B.A. Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. Mutat. Res., 38: 33-42, 1976.

- .. HITOSUGI, M. Epidemiological study of lung cancer with special reference to the effect of air pollution and smoking habitats. Inst. Public Health Bull., 12: 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., 26: 51-83, 1980.

- .. 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.

- .. LEWTAS, J.; GOTO, S.; WILLIAMS, K.; CHUANG, J.C.; PETERSEN, B.A. & WILSON, N.K. The mutagenicity of indoor air particulates in a residential pilot field study; application and evaluation of new methodologies. Atmospheric Environ., 21 (2): 443-449, 1987.

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

- .. McGEORGE, L.S.; LOUIS, J.B.; ALTHERHOLT, T.B. & 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.

- .. McPHERSON, M.F. & NESTMANN, E.R. The SIMULTEST approach for testing mutagens in the *Salmonella* microtitre fluctuation assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 16: 21-25, 1990.

- .. MOLLER, M. & ALFHEIM, I. Mutagenicity of airborne particles in relation to traffic and air pollution parameters. *Environ. Sci. Technol.*, 16: 221-225, 1982.

- .. NESTMANN, E.R.; KOWBEL, D.J.; WHEAT, J.A. Mutagenicity in *Salmonella* of dyes used by defence personnel for the detection of liquid chemical warfare agents. *Carcinogenesis*, 2: 879-883, 1981.

- .. 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.

- .. 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, 1985.

- .. SKOPECK, R.T.; LIBER, H.L.; KROLEWSKI, J.J. & THILLY, W.G.
Quantitative forward mutation assay *Salmonella typhimurium*
using 8-azaguanine resistance as a genetic marker.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 (1): 410-414, 1978.
- .. SORENSON, W.G.; WHONG, W-Z, ; SIMPSON, J.P.; HEARL, F.J. & ONG
T.M. Studies of the mutagenic response of *Salmonella*
typhimurium TA 98 to size-fractionated air particles:
Comparision of the fluctuation and plate incorporation
tests. *Environ. Mutagen.*, 4: 531-541, 1982.
- .. TALCOTT, R. & HARGER, W. Airborne mutagens extracted from
particles of respirable size. *Mutat. Res.*, 72: 177-180,
1980.
- .. 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.
- .. WRIGHT, A.S. The role of metabolism in chemical mutagenesis and
chemical carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 75: 215-241, 1980.

TABELA 1 - Resultados dos diferentes ensaios realizados para as amostras de material particulado de ar.

AMOSTRA	DATA DE COLETA	TESTE DE AMES (revertentes/ ug)		MICROENSAIO DE MUTAÇÃO DIRETA (mutantes/ ug)		SIMULTESTE	
		TA 98		TM 677		Qui-quadrado χ^2	a) significância
		-S9	+S9	-S9	+S9		
395	12.10.89	0,59	1,85	- b)	0,03	134,40	$p < 0,0001$
408	12.01.90	0,35	0,23	-	-	9,13	$p < 0,001$
415	23.11.90	0,73	0,12	-	0,004	5,34	$p < 0,001$

a) P (probabilidade) $\leq 0,05$ = amostra positiva.

b) (-) amostra negativa.

TABELA 2 - Resultados do Teste de Ames e
Microensaio de Mutação Direta
expressos em m³ equivalente.

AMOSTRA	TESTE DE AMES (revertentes/ m ³)		MICROENSAIO DE MUTAÇÃO DIRETA (mutantes/m ³ [10 ⁻⁵])	
	- S9			
PDP				
395	37,56	118,59	- a)	0,614
408	17,43	11,44	-	-
415	37,35	5,96	0,606	0,190

a) (-) amostra negativa

TABELA 3 - Comparação entre o Teste de Ames e o Microensaio de Mutação Direta através da concentração mínima efetiva expressa em **ug.**

AMOSTRA PDP	TESTE DE AMES		MICROENSAIO DE MUTAÇÃO DIRETA	
	-S9	+S9	-S9	+S9
395	79,64	23,42	-	95,52
408	145,35	220,72	-	-
415	69,41	431,62	219,70	105,40

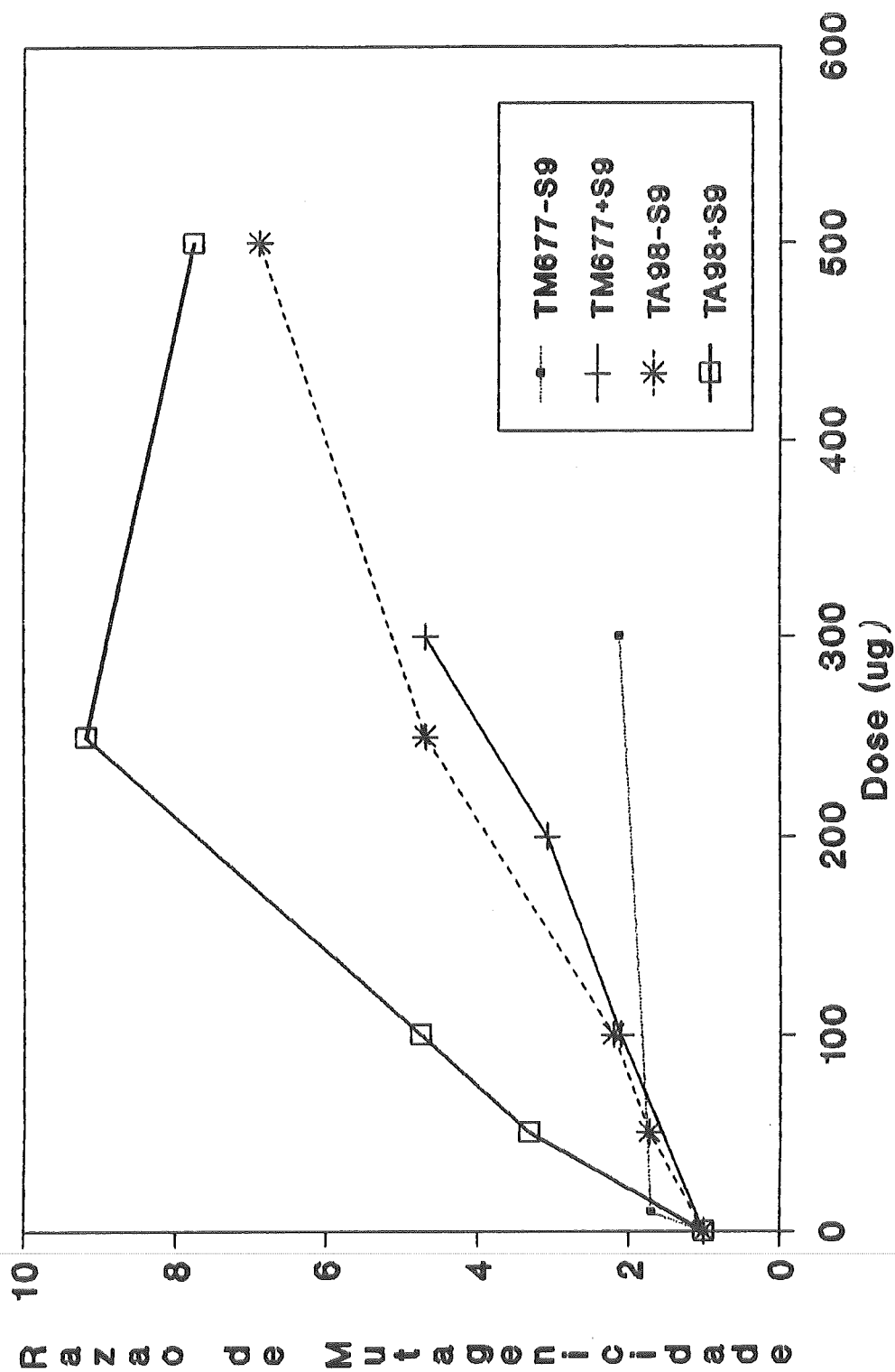


FIG 1 - Comparação entre o Teste de Ames e o Microensaio de Mutação Direta para o extrato orgânico da amostra PDP 395.

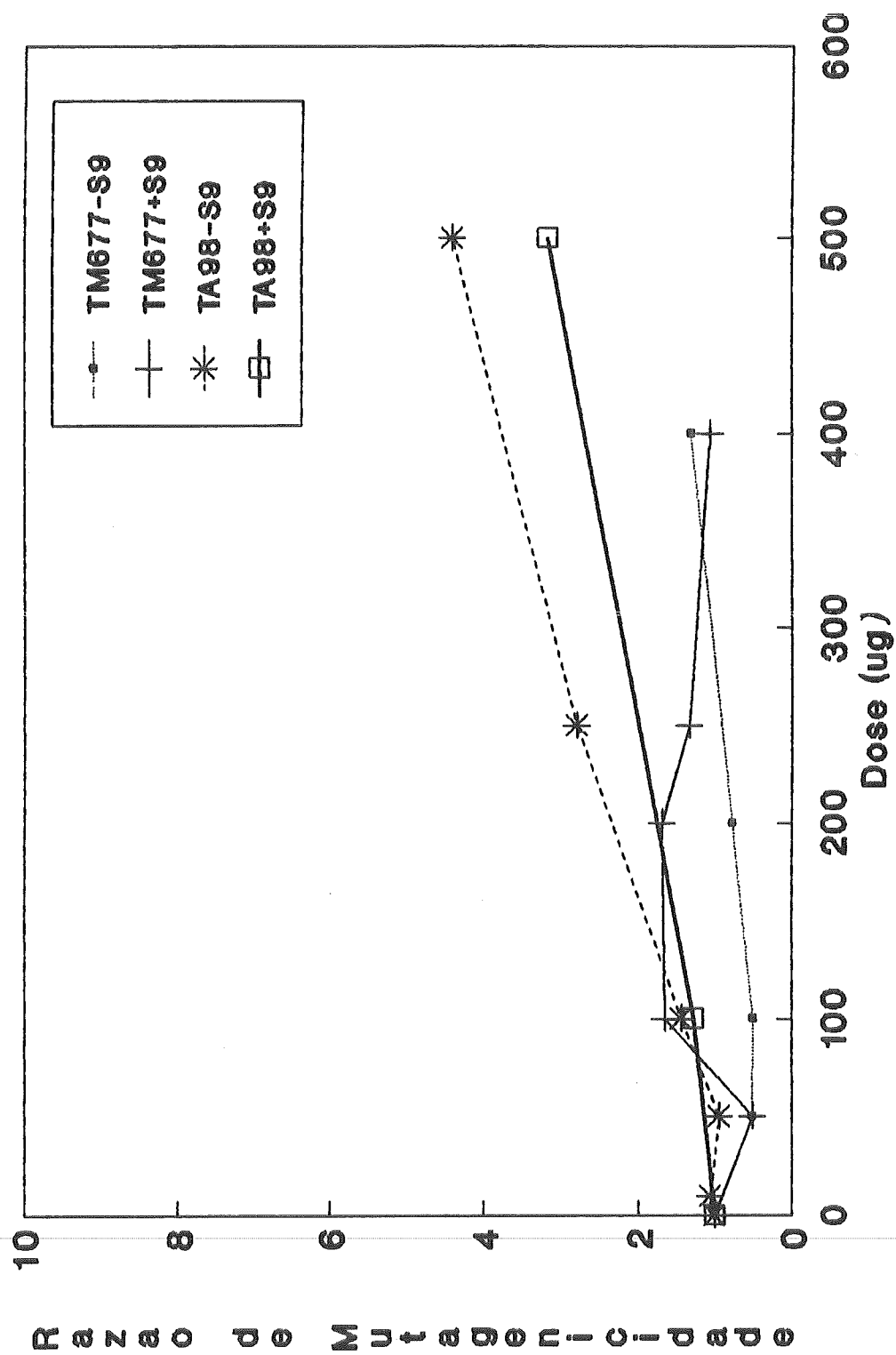


FIG 2 - Comparação entre o Teste de Ames e o Microensaio de Mutação Direta para o extrato orgânico da amostra PDP 408.

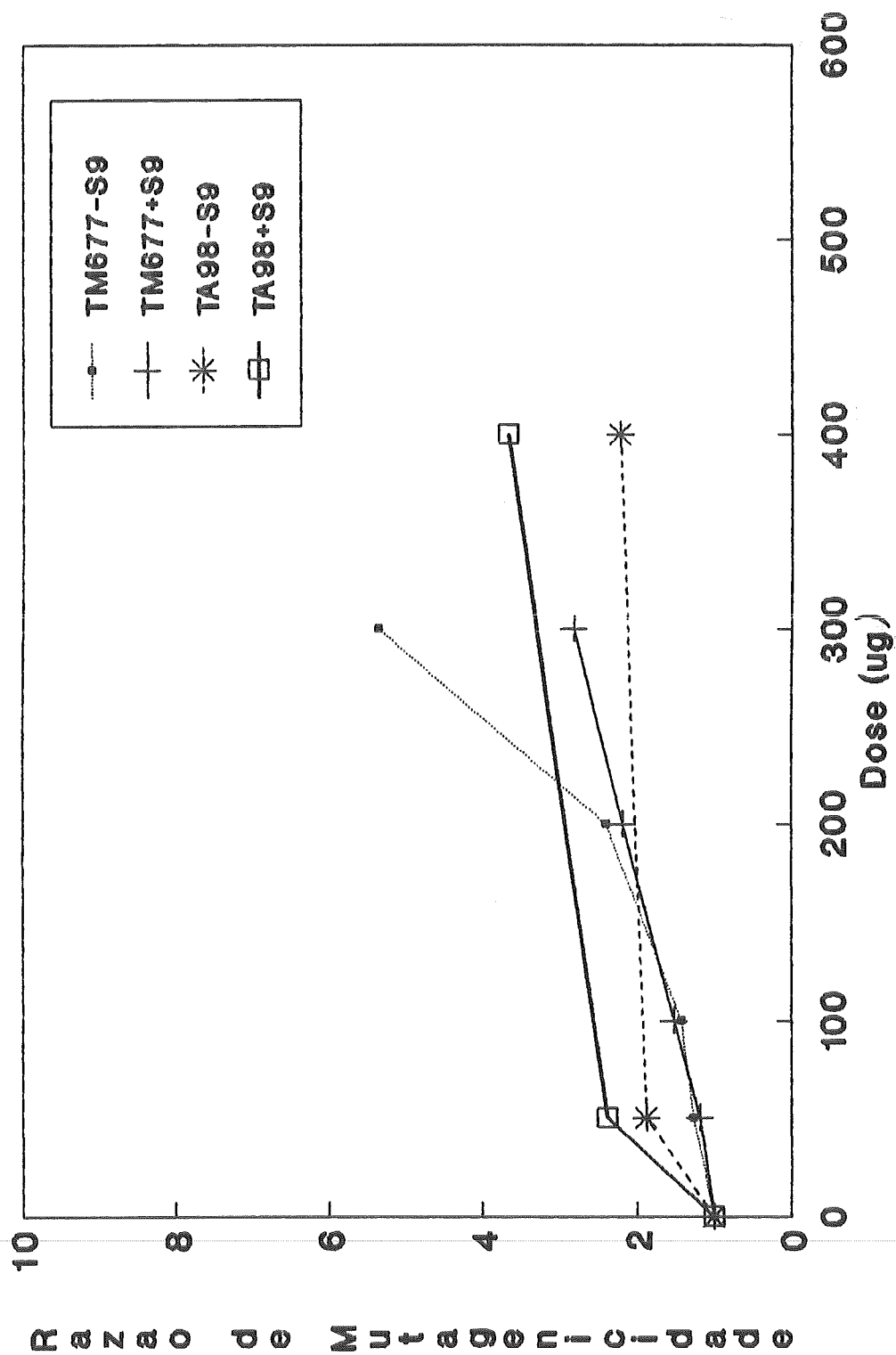
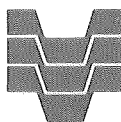


FIG 3 - Comparação entre o Teste de Ames e o Microensaio de Mutação Direta para o extrato orgânico da amostra PDP 415.

35 P.

Data Aguis.: 16/8/95
Indic.:
Livros:
Preço: Cr\$
Data Tomba: 16/8/95



CETESB

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

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

Fone: 210-1100 - Telex 1183053-CETS-BR

CEP 05489 - São Paulo - SP - Brasil