UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

A aplicabilidade de combinações seletivas de linhagens
S. typhimurium na caracterização da mutagenicidade de
amostras de ar

Débora Kristina Magalhães Alves

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE em Ciências

Área de concentração: Toxicologia

Orientadora:
Profa. Dra. Gisela de Aragão
Umbuzeiro

São Paulo
2011

Débora Kristina Magalhães Alves

A aplicabilidade de combinações seletivas de linhagens *S. typhimurium*
na caracterização da mutagenicidade de amostras de ar

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências

Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro
Orientador/presidente

Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

Prof. Dr. Fábio Kummrow

São Paulo, 03 de Outubro de 2011.

À minha amada mãe **Pedrina Magalhães Alves**
Ao meu maravilhoso pai **Marcos Roberto Alves**
À minha querida irmã **Valéria Flávia Magalhães Alves**
por todo amor, apoio
e por acreditarem em mim sempre.

Ao meu amor, **Denis Martins Fernandes**
pelo amor, dedicação, carinho, paciência e apoio sempre doados a mim.

Em memória,
Às minhas amadas e eternas tias **Sebastiana Magalhães**
e Maria Helena Magalhães de Souza
pelo amor, carinho e ternura,
por terem me incentivado e
encorajado a lutar pelos meus sonhos sempre e
por toda dedicação prestada a mim durante toda a vida de vocês.

Amo muito todos vocês

Agradecimentos

Ao Senhor nosso **Deus** por tudo, sem Ele nada sou. À nossa Santíssima mãe Maria, pela intercessão sempre.

À minha orientadora e eterna chefe Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro, por toda a ajuda, paciência, ensinamentos e acima de tudo, por ter despertado em mim o amor pela Toxicologia.

À minha família e ao meu noivo Denis por me apoiarem sempre.

À Coordenação e Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa, CNPq, pelo financiamento do projeto.

Ao Prof. Dr. Fábio Kummrow pela amizade e essencial colaboração em todo o desenvolvimento do projeto.

Ao Gilberto de Almeida, técnico do Laboratório da Faculdade de Tecnologia da Unicamp, pela coleta das amostras de material particulado de ar.

À Anjaina Fernandes de Albuquerque, pela simpatia, amizade e pela extração das amostras do estudo.

À Josiane, Jaqueline, Daniel e ao pessoal do laboratório da Faculdade de Tecnologia da Unicamp, pela amizade, ajuda nos testes finais e troca de informações.

À minha grande amiga e funcionária da CETESB Célia Maria Rech, pela colaboração e parceria.

Aos amigos Wálace Anderson, Daniela Dayrell, Carlos Coimbrão, José Viana, Flávia Mazzini, Rúbia Kuno e a todo o pessoal da CETESB, pelo apoio e amizade.

Ao Centro Universitário Senac, pela ajuda financeira e disponibilização dos laboratórios para a realização dos ensaios.

À Profa. Dra. Silvia Berlanga, pela colaboração e empréstimos de materiais que auxiliaram na realização dos ensaios.

À Profa. Dra. Sandra Farsky, pelo apoio durante toda a dissertação.

À funcionária Leila Aparecida Bonadio, da Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas, pelo auxílio e correção das referências bibliográficas.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, em especial à Profa. Dra. Elizabeth Nascimento e Profa. Ana Paula de Melo Loureiro, pelo carinho e amizade.

Aos alunos do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, pela troca de informações e amizade conquistada.

“Sem sonhos, as pedras do caminho se tornam montanhas,
os pequenos problemas ficam insuperáveis,
as perdas são insuportáveis,
as decepções se transformam em golpes fatais
e os desafios se transformam em fonte de medo.
Os sonhos trazem saúde para a emoção,
equíparam o frágil para ser autor da sua história,
renovam as forças do ansioso,
animam os deprimidos,
transformam os inseguros em seres humanos de raro valor.
Os sonhos fazem os tímidos terem golpes de ousadia e
os derrotados serem construtores de oportunidades.”

Augusto Cury

RESUMO

ALVES, D. K. M. **A aplicabilidade de combinações seletivas de linhagens *S. typhimurium* na caracterização da mutagenicidade de amostras de ar.** 2011. 166 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O material particulado atmosférico é reconhecido como mutagênico. Embora vários compostos já tenham sido identificados nessa matriz, os mesmos não explicam o efeito observado na maioria dos bioensaios realizados. O ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microssoma tem sido amplamente utilizado para a avaliação de amostras atmosféricas o qual é muito sensível na detecção de vários tipos de mutágenos, pois é realizado com diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* na presença e ausência de ativação metabólica exógena. O principal objetivo deste trabalho foi verificar a aplicabilidade da utilização de combinações seletivas de linhagens *S. typhimurium* na caracterização da mutagenicidade de amostras de material particulado total de ar coletado em Limeira, uma cidade do interior do estado de São Paulo sob influência de intenso tráfego, emissões industriais e da agricultura, incluindo o plantio de cana de açúcar. Foram avaliados seis extratos orgânicos obtidos com diclorometano por ultrasonicação, utilizando o método *Salmonella*/microssoma em microssuspensão na presença e ausência de ativação metabólica (mistura S9) em experimentos de dose-resposta, com quantidade máxima de 50 µg de material orgânico extraído (MOE) por placa. Os pares de linhagens utilizados foram: YG1041/TA98, para verificar a presença de nitrocompostos, como 1-nitropireno e/ou aminas aromáticas; YG5161/TA1538, altamente sensível aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) não substituídos como o benzo[a]pireno (BaP); e YG7108/TA1535, para a indicação de agentes alquilantes. Os resultados indicaram que os compostos que podem melhor explicar os efeitos observados são os nitro e/ou aminas aromáticas e não os HPA não substituídos como o BaP. O par YG7108/TA1535 forneceu respostas negativas para todas as amostras. As combinações seletivas de linhagens *S. typhimurium* (YG1041/TA98 e YG5161/TA1538) mostraram-se eficientes na caracterização da mutagenicidade de amostras de ar coletadas na cidade de Limeira, podendo ser utilizadas como uma importante ferramenta de auxílio do ensaio *Salmonella*/microssoma em microssuspensão em estudos de análises químicas direcionadas pelo efeito biológico (ADEB). As potências mutagênicas observadas com a linhagem TA98 para a cidade de Limeira foram similares aquelas verificadas na Região Metropolitana de São Paulo. A comparação das respostas de mutagenicidade observadas para as amostras analisadas com o perfil de compostos puros, encontrados na literatura, não forneceu candidatos que podem representar a mistura. Mais estudos de mutagenicidade com compostos puros utilizando os pares de linhagens propostos (TA98/YG1041 e TA1538/YG5161) e análises químicas de extratos fracionados são necessários para verificar se esta abordagem pode ser útil em estudos de ADEB, e consequentemente na descoberta de novos poluentes atmosféricos.

Palavras-chave: Mutagenicidade do ar; Ensaio *Salmonella*/microssoma em microssuspensão; YG1041; YG5161; YG7108, benzo[a]pireno, nitrocompostos, agentes alquilantes, HPA.

ABSTRACT

ALVES, D. K. M. **The applicability of selective combinations of strains *S. typhimurium* in the characterization of mutagenicity of airborne samples.** 2011. 166 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011

The atmospheric particulate matter is recognized as mutagenic. Although several compounds have been identified in this matrix, they do not explain the observed effect in most bioassays that have been performed. The *Salmonella*/microsome assay has been widely used for the evaluation of atmospheric samples. The assay is very sensitive in the detection of various types of mutagens, because it is performed with different strains of *Salmonella typhimurium* in the presence and absence of exogenous metabolic activation. The main objective of this work was to verify the applicability of selective combination of strains in the characterization of mutagenicity of total airborne particulate matter collected in Limeira, a São Paulo State city in a site influenced by heavy traffic, industrial and agricultural emissions, including sugar cane plantations. We tested six extracts obtained with methylene chloride by ultrasonication using the *Salmonella*/microsome microsuspension protocol in the presence and absence of rat liver S9 in dose response experiments, using 50 µg of extractable organic matter (EOM) as a maximum dose per plate. The following pairs of strains were used: YG1041/TA98, to verify the presence of nitro-compounds, as 1-nitropyrene and/or aromatic amines; YG5161/TA1538, highly sensitive to non-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as benzo[a]pyrene (BaP); and YG7108/TA1535, for the indication of alkylating agents. The results indicated that the compounds that can better explain the observed effect are the nitro and/or aromatic amines and not non-substituted PAHs such as BaP. The pair YG7108/TA1535 provided negative responses for all the samples. Selective combinations of *S. typhimurium* strains (YG1041/TA98 and YG5161/TA1538) proved efficient in the characterization of mutagenicity of airborne samples collected in the city of Limeira and can be used as an important tool for the *Salmonella*/microsome microsuspension assay in effect directed chemical analysis (EDA) studies. The mutagenic potencies observed with TA98 strain for the city of Limeira were similar to those verified in the Metropolitan Region of São Paulo. The comparison of the observed mutagenicity responses for the samples analyzed with the profiles of pure compounds found in the literature did not provide any candidates that could alone represent the mixture. More mutagenicity studies with pure compounds using the proposed pair of strains (TA98/YG1041 and TA1538/YG5161) along with chemical analysis of fractioned extracts are needed to verify if this approach can be useful in EDA studies, and consequently in the discovery of new air priority pollutants.

Keywords: Airborne particulate matter mutagenicity; *Salmonella*/microsome microsuspension assay; YG1041; YG5161; YG7108; nitro-compounds; benzo[a]pyrene; PAHs; alkylating agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da localização da Faculdade de Tecnologia (FT) da UNICAMP, Campus I - Limeira e do amostrador HI-VOL.....	61
Figura 2 - Esquema do Amostrador HI-VOL.....	62
Figura 3 - Amostrador HI-VOL aberto no momento da calibração.....	64
Figura 4 - Esquema dos itens do kit de calibração.....	64
Figura 5 - Amostrador HI-VOL com o filtro de fibra de vidro já colocado.....	68
Figura 6 - Esquema da extração dos compostos orgânicos.....	71
Figura 7 - Placas de ágar mínimo com colônias <i>his⁺</i> de <i>S. typhimurium</i>	81
Figura 8 - Esquema do teste de <i>Salmonella</i> /microsoma – método em microssuspensão.....	88
Figura 9 - Concentrações de PTS observadas para as amostras do estudo em comparação com os padrões primários e secundários da qualidade do ar	96
Figura 10 - Placas de ágar mínimo suplementado com biotina (A) e com biotina e histidina (B) após o teste de auxotrofia para o aminoácido histidina (<i>his</i> ⁻).....	99
Figura 11 - Placas de ágar nutriente após os testes de deleção do gene <i>uvrB</i> (A) e de presença da mutação <i>rfa</i> (B).....	100
Figura 12 - Placa de ágar mínimo suplementado com biotina, histidina e uma faixa do antibiótico canamicina - teste de resistência ao antibiótico.....	101
Figura 13 - Comparação da potência mutagênica (rev./µg de MOE) das amostras do estudo entre as linhagens TA98 e YG1041 na ausência (A) e presença (B) de ativação metabólica (S9).....	105
Figura 14 - Comparação da potência mutagênica (rev./µg de MOE) das amostras do estudo entre as linhagens TA1538 e YG5161 na ausência (A) e presença (B) de ativação metabólica (S9).....	109
Figura 15 - Potência mutagênica (rev./ µg de MOE) das linhagens TA98(A), YG1041(B), TA1538(C) e YG5161(D) comparando as condições de ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica.....	111
Figura 16 - Curvas dose resposta do 1-NP com as linhagens TA98/YG1041 (A e B) e TA1538/YG5161 (C e D) na ausência e presença de S9.....	113
Figura 17 - Curvas dose resposta do benzo[a]pireno com as linhagens TA98, YG1041, TA1538 e YG5161 na presença de S9.....	114

Figura 18 - Curvas dose resposta do etilmetano sulfonato com as linhagens TA1535 e YG7108 na ausência e presença de S9.....	115
Figura 19 - Comparação entre as potências mutagênicas observadas entre as amostras do estudo e os dados publicados na literatura.....	116
Figura 20 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as amostras do estudo para o par de linhagens YG1041/TA98 na ausência de S9.....	119
Figura 21 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as amostras do estudo para o par de linhagens YG1041/TA98 na presença de S9.....	121
Figura 22 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as amostras do estudo para o par de linhagens YG5161/TA1538 na ausência de S9.....	122
Figura 23 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as amostras do estudo para o par de linhagens YG5161/TA1538 na presença de S9.....	123
Figura 24 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as amostras do estudo para o par de linhagens TA98/TA1538 na ausência de S9.....	124
Figura 25 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com uma amostra do estudo (AMOSTRA 01-AR) para os pares de linhagens TA98/TA1538, YG1041/TA98 e YG5161/TA1538 na ausência de S9.....	128
Figura 26 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com uma amostra do estudo (AMOSTRA 01-AR) para os pares de linhagens TA98/TA1538, YG1041/TA98 e YG5161/TA1538 na presença de S9.....	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Potência mutagênica de 13 compostos químicos com o par YG1041/TA98 de <i>S. typhimurium</i>	39
Tabela 2 – Potência mutagênica de 30 compostos com as linhagens TA1538, TA98 e YG5161 de <i>S. typhimurium</i>	46
Tabela 3 – Potência mutagênica de 11 compostos com o par TA1535/YG7108 de <i>S. typhimurium</i>	49
Tabela 4 – Detecção da atividade mutagênica expressa em número de revertentes por µg de MOE observada em amostras de ar da literatura.....	51
Tabela 5 – Detecção da atividade mutagênica expressa em número de revertentes por m ³ observada em amostras de ar da literatura.....	53
Tabela 6 – Detecção da atividade mutagênica expressa em número de revertentes por µg de material particulado (MP) observada em amostras de ar da literatura.....	55
Tabela 7 – Substâncias adicionadas aos meios para a preparação das culturas permanentes.....	79
Tabela 8 – Genótipos e tipo de mutação preferencialmente detectado pelas linhagens de <i>S. typhimurium</i> utilizadas.....	83
Tabela 9 – Dados das condições climáticas nos dias de coleta das amostras do estudo.....	94
Tabela 10 - Caracterização das amostras do estudo.....	95
Tabela 11 - Concentrações de PTS e de MOE das amostras do estudo.....	98
Tabela 12 - Faixa dos resultados observados para os testes de confirmação dos genótipos (mutação <i>rfa</i> e reversão espontânea).....	100
Tabela 13 - Potência mutagênica expressa por massa de extrato orgânico (rev./µg de MOE) e por volume de ar (rev./m ³) para as amostras procedentes do estudo frente à linhagem TA98 na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica.....	103
Tabela 14 – Potência mutagênica expressa por massa de extrato orgânico (rev./µg de MOE) e por volume de ar (rev./m ³) para as amostras procedentes do estudo frente à linhagem YG1041 na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica.....	104
Tabela 15 – Potência mutagênica expressa por massa de extrato orgânico (rev./µg de MOE) e por volume de ar (rev./m ³) para as amostras procedentes do estudo frente à linhagem TA1538 na ausência (-S9) e	

presença (+S9) de ativação metabólica.....	107
Tabela 16 – Potência mutagênica expressa por massa de extrato orgânico (rev./µg de MOE) e por volume de ar (rev./m ³) para as amostras procedentes do estudo frente à linhagem YG5161 na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica.....	107
Tabela 17 - Potência mutagênica (rev./ng) observada para os compostos puros considerados candidatos a representantes da mistura complexa.....	126

LISTA DE APÊNDICE

Apêndice A – Tabelas com os dados brutos do ensaio <i>Salmonella</i> /microsossoma em microssuspensão.....	142
Tabela A1 - Resultados para o ensaio <i>Salmonella</i> com a linhagem TA98.....	143
Tabela A2 - Resultados para o ensaio <i>Salmonella</i> com a linhagem YG1041.....	145
Tabela A3 - Resultados para o ensaio <i>Salmonella</i> com a linhagem TA1538.....	147
Tabela A4 - Resultados para o ensaio <i>Salmonella</i> com a linhagem YG5161.....	149
Tabela A5 - Resultados para o ensaio <i>Salmonella</i> com a linhagem TA1535.....	151
Tabela A6 - Resultados para o ensaio <i>Salmonella</i> com a linhagem YG7108.....	153
Tabela A7 - Resultados do branco da extração para o ensaio <i>Salmonella</i>	155

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Modelo de Formulário de Calibração do HI-VOL.....	157
--	-----

ANEXOS OBRIGATÓRIOS

ANEXO B - Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado.....	158
--	-----

ANEXO C - Currículo Lattes.....	159
--	-----

ANEXO D - Ficha do Aluno atualizada.....	164
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1-AA	1-Aminoantraceno
1-NP	1-Nitropireno
2-AA	2-Aminoantraceno
4-NOP	4-Nitro-o-diamino-fenilina
4-NQO	4-Nitroquinolina-1-óxido
ACE	Acetona
ADEB	Análises Direcionadas pelo Efeito Biológico
ANOVA	Análise de variância
AT	Acetiltransferase
BaP	Benzo[a]pireno
BghiP	Benzo[ghi]pirileno
BNNG	<i>N</i> -butil- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitroguanidina
CG/EM	Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CX	Ciclohexano
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDA	<i>Effect Directed Analysis</i>
EMS	Etilmetano sulfonato
ENNG	<i>N</i> -etil- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidina
FT	Faculdade de Tecnologia
HI-VOL	Amostrador <i>High-Volume</i>
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IP	Indeno[1,2,3-cd]pireno
IPCS	<i>International Programme on Chemical Safety</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
MNNG	<i>N</i> -metil- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidina,
MOE	Material Orgânico Extraído
MP	Material Particulado
MP₁₀	Material particulado com tamanho $\leq 10 \mu\text{m}$
MP_{2,5}	Material particulado com tamanho $\leq 2,5 \mu\text{m}$
NR	Nitroredutases

O⁴-MeT	O ⁴ -Metiltimina
O⁶-MeG	O ⁶ -Metilguanina
O-AT	O-acetiltransferases
PNNG	N-propil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
ppt	Partes por trilhão
PTS	Partículas Totais em Suspensão
q.s.p.	Quantidade suficiente para
Rev.	Revertentes
RM	Razão de Mutagenicidade
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
S9	Ativação metabólica exógena
SBMCTA	Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
2.1 Extração dos compostos orgânicos do material particulado de ar.....	27
2.2 Mutagenicidade do material particulado de ar.....	28
2.2.1 Mutagenicidade detectada em amostras de material particulado de ar de outros países.....	29
2.2.2 Mutagenicidade detectada em amostras de material particulado de ar no Brasil....	31
2.2.2.1 Mutagenicidade detectada no Rio Grande do Sul.....	31
2.2.2.2 Mutagenicidade detectada em São Paulo.....	34
2.3 Mutagenicidade detectada com as combinações seletivas utilizadas no estudo.....	36
2.3.1 Detecção da mutagenicidade com o par YG1041/TA98.....	36
2.3.2 Detecção da mutagenicidade com o par YG5161/TA1538.....	44
2.3.3 Detecção da mutagenicidade com o par YG7108/TA1535.....	48
3 OBJETIVOS.....	56
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
4.1 Amostragem.....	59
4.1.1 Caracterização da área de estudo.....	59
4.1.2 Ponto de amostragem.....	60
4.1.3 Preparação para coleta das amostras.....	61
4.1.3.1 Amostrador HI-VOL.....	61
4.1.3.2 Calibração do amostrador HI-VOL.....	62
4.1.3.2.1 Procedimento para calibração.....	62
4.1.3.2.2 Cálculo e expressão dos resultados.....	65
4.1.3.3 Preparação dos filtros.....	66
4.1.4 Coleta das amostras.....	67
4.1.4.1 Cálculo do volume de ar.....	68
4.1.4.2 Determinação da quantidade e da concentração de material particulado.....	69
4.1.5 Extração dos compostos orgânicos.....	70
4.1.5.1 Procedimento da extração orgânica.....	70
4.1.5.2 Concentração dos extratos.....	71
4.1.5.3 Determinação da quantidade de Material Orgânico Extraído.....	72

4.1.6	Ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma.....	72
4.1.6.1	Preparação dos meios de cultura e soluções.....	72
4.1.6.2	Esterilização e teste de esterilidade.....	79
4.1.6.3	Lavagem de vidraria.....	79
4.1.7	Ensaio de <i>Salmonella</i> /microsoma em microssuspensão.....	80
4.1.7.1	Linhagens utilizadas no ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma.....	82
4.1.7.2	Preparo da cultura permanente.....	83
4.1.7.3	Procedimento do ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma.....	86
4.1.7.3.1	Protocolo do método em microssuspensão.....	86
4.1.7.3.2	Interpretação de resultados e análises estatísticas.....	89
4.1.7.4	Validação das combinações seletivas de linhagens <i>S. typhimurium</i>	90
4.1.7.5	Comparação da mutagenicidade observada com dados da literatura.....	91
4.2	Ensaio Interlaboratorial.....	91
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
5.1	Condições climáticas.....	94
5.2	Partículas Totais em Suspensão.....	95
5.3	Material Orgânico Extraído.....	97
5.4	Ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma.....	98
5.4.1	Teste de genótipo das linhagens de <i>S. typhimurium</i>	98
5.4.2	Potência mutagênica das amostras de material particulado de ar para as linhagens de <i>S. typhimurium</i>	102
5.4.2.1	Linhagens TA98 e YG1041 de <i>S. typhimurium</i>	102
5.4.2.2	Linhagens TA1538 e YG5161 de <i>S. typhimurium</i>	106
5.4.2.3	Linhagens TA1535 e YG7108 de <i>S. typhimurium</i>	109
5.4.3	Efeito do sistema de metabolização (mistura S9) na mutagenicidade do material particulado de ar.....	110
5.4.4	Validação das combinações seletivas de linhagens de <i>S. typhimurium</i>	111
5.4.4.1	Par YG1041/TA98.....	111
5.4.4.2	Par YG5161/TA1538.....	113
5.4.4.3	Par YG7108/TA1535.....	115
5.4.5	Comparação da mutagenicidade observada com dados da literatura.....	116
5.4.5.1	Trabalhos de material particulado de ar.....	116
5.4.5.2	Trabalhos com compostos puros.....	119
5.5	Ensaio Interlaboratorial.....	129

6	CONCLUSÕES.....	130
	REFERÊNCIAS.....	132
	APÊNDICE.....	142
	ANEXOS.....	156

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

A poluição atmosférica pode ser definida como toda e qualquer forma de matéria sólida, líquida ou gasosa, que presente na atmosfera possa alterar suas condições normais levando à possível ocorrência de efeitos adversos. Em geral os poluentes atmosféricos são classificados em dois grupos: material particulado e gases e de acordo com sua origem, podem ser classificados como poluentes primários ou secundários. Os poluentes primários são aqueles emitidos diretamente na atmosfera, e os secundários são formados na atmosfera por reações químicas ou fotoquímicas (ASSUNÇÃO, 2010).

O material particulado de ar (MP) pode ser definido como uma mistura de compostos sólidos e líquidos dispersos em um meio gasoso, com diâmetro variando entre 0,001 e 100 μm . Pode ser classificado segundo método de formação, em poeiras (poeira de cimento, de amianto, de algodão, de rua), fumos (fumos de chumbo, de alumínio, de zinco, de cloreto de amônia), fumaça - partículas de combustão de materiais fósseis, madeira, contêm fuligem, partículas líquidas e, no caso de madeira e carvão, uma fração mineral (cinzas), e névoas – partículas líquidas (ASSUNÇÃO; MALHEIROS, 2005).

Nos últimos anos, o MP vem recebendo muita atenção por diferentes motivos, sendo eles: a interferência nos processos climáticos, podendo ser direta por meio da absorção e reflexão da irradiação solar, ou indireta, pela formação de núcleos de condensação das nuvens; o prejuízo na visibilidade causado pela alta concentração de partículas finas; e, o impacto negativo significativo gerado na saúde dos seres humanos (WALGRAEVE et al., 2010).

O material particulado de ar é reconhecido como mutagênico, pois apresenta genotoxinas que podem interagir com o DNA dos organismos vivos e causar diferentes tipos de alterações. Quando estes danos não são reparados pode ocorrer uma modificação permanente na estrutura do DNA, denominada mutação, ou ainda causar a morte da célula ou do organismo. As mutações que envolvem alterações

específicas na sequência de um gene são chamadas de mutações de ponto (SNUSTAD; SIMMONS, 2001).

A mutagenicidade do ar já foi relacionada a aproximadamente 500 tipos de compostos pertencentes a diversas classes químicas diferentes. Dentre estes, os compostos mais estudados têm sido os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), porém a sua presença não explica a maior parte do efeito mutagênico associado ao material particulado de ar (CLAXTON; MATTHEWS; WARREN, 2004). Parte desta mutagenicidade vem sendo associada a compostos com polaridade alta ou mediana, como os compostos nitroaromáticos e as aminas e cetonas aromáticas (CLAXTON; MATTHEWS; WARREN, 2004; UMBUZEIRO et al., 2008a, 2008b).

Muitos dos compostos mutagênicos também são capazes de induzir câncer e esta preocupação tem dirigido a maioria dos estudos de mutagenicidade. Cada vez mais trabalhos evidenciam que a exposição por longos períodos às partículas finas pode representar um importante risco à saúde, pois contribuem para a incidência de várias doenças, incluindo o câncer de pulmão e doenças cardio-respiratória (POPE III et al., 2002; KREWSKI et al., 2005). Pope III et al. (2002) associaram a elevação de partículas finas por metro cúbico com o aumento na mortalidade por câncer. Segundo estimativa de Boffetta (2006), 10,7% dos casos de câncer de pulmão (>25.000 casos) ou cerca de 1% de todos os casos de câncer na Europa pode estar relacionado à poluição do ar.

Não existe ambiente livre de mutágenos (UMBUZEIRO; MACHALA; WEISS, 2011) e as fontes destes mutágenos atmosféricos podem ser naturais como as queimadas das florestas sem a intervenção do Homem, ou antropogênicas, caracterizadas principalmente pelas emissões veiculares e industriais. Estes compostos podem ser orgânicos ou inorgânicos, mas devido ao limitado número de compostos inorgânicos capazes de causar danos ao material genético, eles podem ser facilmente detectados com o auxílio de análises químicas. Já para a detecção de compostos orgânicos mutagênicos, o uso somente de análises químicas se torna uma ferramenta limitada devido ao grande número de compostos presentes, e que na maioria das vezes esta presença ocorre em baixíssimas concentrações, como em partes por trilhão (ppt). Desta forma, a maioria dos estudos de caracterização ou monitoramento ambiental utiliza análises químicas de compostos alvo e, mais

recentemente, os bioensaios. Com relação aos ensaios de mutagenicidade não tem sido observada boa correlação entre os compostos identificados e atividade mutagênica, ficando assim evidente que os compostos que estão causando o efeito observado necessitam ainda serem identificados. Nestes casos, as análises químicas direcionadas pelo efeito biológico (ADEB), do inglês *effect directed analysis* (EDA), tem sido uma ferramenta desenvolvida para auxiliar a identificação de compostos orgânicos tóxicos/genotóxicos presentes em misturas complexas (UMBUZEIRO; MACHALA; WEISS, 2011).

Os diferentes bioensaios utilizados para avaliar a presença destes compostos biologicamente ativos, fornecem informações valiosas sobre a identificação do perigo ao qual a população está exposta, permitem comparações entre diferentes locais, indicam as principais classes de compostos químicos presentes nas amostras e auxiliam na avaliação de risco à saúde humana em programas de monitoramento da qualidade do ar (CLAXTON; WOODALL Jr., 2007).

O ensaio *Salmonella*/microsossoma é um teste de mutagenicidade realizado com a enterobactéria *Salmonella typhimurium*, foi desenvolvido na década de 70 (AMES et al., 1973a, 1973b) e tem sido extensamente utilizado como uma ferramenta de monitoramento da atividade mutagênica de extratos orgânicos de material particulado de ar, inclusive no Brasil (SATO et al., 1995; DUCATTI; VARGAS, 2003; UMBUZEIRO et al., 2008a, 2008b). Claxton e Woodall Jr. (2007) observaram que dentre os ensaios de mutagenicidade e carcinogenicidade utilizados para avaliação da poluição do ar, o ensaio *Salmonella*/microsossoma, é o mais utilizado correspondendo a 45% dos trabalhos publicados. Este ensaio tem sido muito útil para comparar a atividade genotóxica entre diferentes regiões ao redor do mundo, condições meteorológicas, fontes de poluição fixas e móveis (CLAXTON; MATTHEWS; WARREN, 2004) incluindo regiões onde ocorre a queima da cana de açúcar (UMBUZEIRO et al., 2008a). São vários os protocolos utilizados dentre eles podemos citar: o descrito por Maron e Ames (1983), Kado, Langley e Eisenstadt (1983) e Mortelmans e Zeiger (2000) e os métodos geralmente são de incorporação em placas (SATO et al., 1995; CERNÁ et al., 1999; DOBIÁS et al., 1999; VILLALOBOS-PIETRINI et al., 2007), de pré-incubação (AZUMA et al., 1997) e em microssuspensão (Teste de Kado) (SATO, 1995; AZUMA et al., 1997; DE MARTINIS et al., 1999; DUCATTI; VARGAS, 2003; UMBUZEIRO et al., 2008a, 2008b). O

ensaio *Salmonella*/microsossoma em microssuspensão é considerado de 5 a 10 vezes mais sensível do que o protocolo de incorporação em placas, sendo muito utilizado quando se dispõe de pouca quantidade de amostra (MORTELMANS; ZEIGER, 2000), ou ainda quando se pretende utilizar maior número de linhagens. O resultado do ensaio é expresso em número de revertentes por massa ou volume de amostra testada e comparações entre as respostas somente podem ser feitas utilizando o mesmo método.

Em virtude de diferentes mutações no gene responsável pela síntese do aminoácido histidina (*his*⁻), as linhagens utilizadas no ensaio são incapazes de crescer em meio de cultura sem adição de histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem sua capacidade de síntese, é o que chamamos de reversão da mutação. Cada linhagem possui ainda capacidades metabólicas específicas ou diferentes tipos de reparo do dano causado no DNA e, desta forma, respondem diferentemente à variadas classes de compostos químicos existentes nas amostras. Por meio das respostas obtidas (número de revertentes) é possível identificar quais os compostos majoritários estão presentes nas amostras (ROUBICEK; UMBUZEIRO, 2006).

A detecção do ensaio ocorre com mutágenos que interagem diretamente com o DNA, como o metilmetanosulfonato e também com mutágenos que requerem ativação metabólica para se tornarem ativos. A bioativação destes compostos pode ser fornecida por enzimas bacterianas endógenas (como exemplo, nitroredutases e acetiltransferases), ou ainda por um sistema exógeno, contendo enzimas do citocromo P450 providas de homogenados de fígado de rato, peixes e de seres humanos (UMBUZEIRO; MACHALA; WEISS, 2011). Desta forma, o ensaio *Salmonella*/microsossoma fornece esta bioativação necessária através de algumas linhagens contendo enzimas específicas (por exemplo, YG1041) ou por meio de uma fração microsossomal de células de fígado de rato (S9) e cofatores que irão promover ativação metabólica *in vitro* para aqueles compostos que necessitam ser metabolizados como o benzo[a]pireno (BaP), aflatoxinas e outros.

Segundo Claxton e Woodall Jr. (2007), uma limitação do ensaio *Salmonella*/microsossoma refere-se à má interpretação dos resultados quando se utilizam poucas ou uma única linhagem. Por exemplo, ao se avaliar a

mutagenicidade do ar em uma região altamente impactada por emissões industriais com altos níveis de HPA e por emissões de diesel que contém nitroaromáticos, a utilização de apenas uma linhagem altamente sensível para a detecção de compostos nitroaromáticos pode levar a má interpretação dos resultados, pois a resposta aos HPA pode ser mascarada.

Sabendo que a maioria dos estudos, até o momento, utiliza um número mínimo de linhagens e levando em consideração a importância dos bioensaios na caracterização do potencial mutagênico do material particulado de ar, o nível de comprometimento da qualidade do ar e a escassa informação sobre a identificação de poluentes orgânicos mutagênicos na atmosfera, este trabalho analisou seis extratos orgânicos por meio do ensaio *Salmonella*/microsoma em microcrossuspensão com combinações seletivas de linhagens, sendo elas: o par YG1041/TA98, para verificar a presença de nitrocompostos e/ou aminas aromáticas; o par YG5161/TA1538, para avaliar a presença de HPA não substituídos; e o par YG7108/TA1535 para identificar se há compostos alquilantes presentes nas amostras.

2. Revisão Bibliográfica

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este item aborda uma revisão dos principais trabalhos publicados na literatura sobre a extração de compostos orgânicos e a mutagenicidade observada em amostras de material particulado de ar no Brasil e em outros países.

2.1 Extração dos compostos orgânicos do material particulado de ar

As amostras de material particulado de ar são quimicamente muito complexas, contendo centenas de compostos orgânicos, muitos deles em concentrações extremamente baixas. Geralmente, a fração orgânica do material particulado é separada da porção inorgânica através de um solvente orgânico utilizando o método de soxhlet ou agitação por ultrasonicação (SATO, 1995).

Em relação ao método, a extração por Soxhlet tem sido a mais comum entre os trabalhos, seguido pelo método de ultrasonicação, porém alguns pesquisadores demonstraram que a formação de artefatos ocorre mais facilmente com a extração por Soxhlet (MARVIN; HEWITT, 2007). Krewiski et al. (1992), também confirmaram este fato, onde por meio de um estudo interlaboratorial do “*International Programme on Chemical Safety - IPCS*” foi possível avaliar fontes de variações na potência de mutagenicidade de misturas químicas complexas avaliadas frente ao ensaio *Salmonella*/microsoma. Os autores observaram que não houve diferença significativa na potência dos resultados obtidos entre os laboratórios que utilizaram a extração por soxhlet e os que usaram ultrasonicação, embora tenha sido detectada maior variação interlaboratorial para o método de soxhlet.

No processo de extração, uma grande variedade de solventes pode ser utilizada, sejam puros (AGURELL; STENSMAN, 1992; SATO, 1995; AZUMA et al., 1997; UMBUZEIRO et al., 2008a; 2008b), em misturas (SHARMA et al., 2007), ou em série (DE MARTINIS et al., 1999; DUCATTI; VARGAS, 2003). O Diclorometano (DCM) é um dos solventes mais utilizados na literatura por conseguir extrair uma grande quantidade destes compostos orgânicos (CLAXTON; MATTHEWS; WARREN, 2004). Para Marvin e Hewitt (2007), o DCM tem sido utilizado pela maioria dos trabalhos que realizaram extração com um único solvente, e sua preferência se dá pela exclusão de compostos não-polares tóxicos para as bactérias usadas em bioensaios.

Dados da literatura relatam que a técnica de extração por banho de ultrassom utilizando o DCM como solvente extrai entre 4,5 e 11,2% da massa do material particulado de ar (MAY et al., 1992; ADONIS; GIL, 1993). Várias técnicas têm sido empregadas para fracionar o extrato orgânico do material particulado de ar, seja para a realização de uma análise química ou de mutagenicidade, entre elas, pode-se incluir a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (UMBUZEIRO et al., 2008a, 2008b) e extração em coluna de sílica (DOBIÁS et al., 1999).

2.2 Mutagenicidade do material particulado de ar

Os principais trabalhos publicados são abordados neste item demonstrando a mutagenicidade detectada em amostras coletadas em alguns países, e posteriormente no Brasil, que utilizaram uma única linhagem ou outros pares de linhagens seletivas de *S. typhimurium*, os quais não foram utilizados neste estudo, com o ensaio *Salmonella*/microsoma. No final do capítulo, um resumo da mutagenicidade detectada com as principais linhagens foi apresentado nas tabelas 4, 5 e 6.

2.2.1 Mutagenicidade detectada em amostras de material particulado de ar de outros países

Em 1986, Kado et al., avaliaram amostras de material particulado de ar (MP_{2,5}) de Martinez, CA, Estados Unidos por meio do ensaio *Salmonella*/microsossoma em microssuspensão com a linhagem TA98. Todas as amostras apresentaram atividade mutagênica na ausência (85-296 rev./m³) e na presença de S9 (304 – 727 rev./m³) (CLAXTON et al., 2001), sendo claramente observado um aumento na mutagenicidade após a adição de S9, indicando a forte contribuição de compostos que necessitam de ativação metabólica nas amostras de material particulado de ar de Martinez (EUA).

Como parte de um estudo colaborativo em misturas complexas do “*IPCS*”, Bagley et al. (1992), analisaram amostras de material referência (material particulado de ar urbano e de diesel) fornecidos pelo “*National Institute of Standards*”. Os extratos foram obtidos pelo método Soxhlet com o solvente DCM e testados por meio do ensaio *Salmonella*/microsossoma em microssuspensão com as linhagens TA98, TA98NR (deficiente para nitroredutases) e TA98/1,8DNP₆ (deficiente para *O*-acetiltransferases). A maior atividade mutagênica foi observada para as amostras de material particulado de diesel com 66 e 68 rev./µg de Material Orgânico Extraído (MOE) (TA98), na ausência e na presença de S9, respectivamente. Para as amostras de ar urbano, 4,5 e 3,5 rev./µg de MOE foram observados na ausência e presença de S9. O uso da ativação metabólica não apresentou efeitos significantes na mutagenicidade das amostras. De acordo com a resposta das linhagens sensíveis na detecção de nitrocompostos, a maior parte da atividade mutagênica detectada nos extratos de diesel foi devido aos nitrocompostos porque houve significativa redução nas atividades das linhagens TA98NR e TA98/1,8DNP₆. Nos extratos de ar, apenas a linhagem TA98/1,8DNP₆ apresentou resultados significantes indicando a presença de dinitrocompostos nestas amostras.

Aguirell e Stensman (1992), participando do mesmo estudo colaborativo sobre misturas complexas do “*IPCS*”, testaram três amostras (material particulado de ar

urbano, de diesel, e um extrato de alcatrão de carvão contendo HPA) usando o ensaio *Salmonella*/microsossoma em microssuspensão com as linhagens TA98 e TA100 (detecta mutágenos que causam substituição de pares de bases). Também foi avaliada a mutagenicidade dos compostos puros como o BaP e 1-nitropireno (1-NP), em virtude da composição do extrato de alcatrão ser de HPA e do MP de diesel conter nitro-HPA. O local de coleta do material particulado não foi informado, mas os extratos orgânicos foram obtidos por ultrasonicação com DCM. Todas as três misturas complexas testadas foram mutagênicas na ausência e na presença de S9. A resposta para a amostra de MP urbano foi maior com a linhagem TA98 na ausência de S9 (2 rev./µg de MOE), do que na presença (0,9 rev./µg de MOE), enquanto que as outras duas misturas apresentaram maior mutagenicidade com a linhagem TA100 na presença de S9. Para os compostos puros, o BaP apresentou maior resposta mutagênica com a linhagem TA100+S9 (3,4 rev./ng) e o 1-NP com a TA98-S9 (47,3 rev./ng), sugerindo um possível acordo das respostas obtidas entre as misturas complexas e os compostos puros.

Monarca et al. (1997), examinaram a presença de compostos mutagênicos no material particulado de ar de uma área residencial de Bréscia na Itália, em relação ao tamanho das partículas coletadas separadamente (<0,5 µm, 0,5 – 0,95 µm, 0,95 – 1,5 µm, 1,5 – 3 µm, 3 – 7,2 µm e 7,2 - 10 µm). Os extratos foram obtidos por equipamento Soxhlet com DCM e testados frente ao ensaio *Salmonella*/microsossoma em microssuspensão com as linhagens TA98 e TA98/1,8-DNP₆. Foram realizadas também análises para avaliação de HPA por meio de cromatografia a gás com alta-resolução. Em relação à análise química, quantidades traços de HPA (benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno) foram encontradas em todas as amostras, sendo a maior parte identificada nas partículas finas (0,5 µm). Todas as amostras apresentaram mutagenicidade com a linhagem TA98 na ausência de ativação metabólica (0,31 – 0,94 rev./µg de MOE e 2 – 7,6 rev./m³), revelando a presença de mutágenos de ação direta. A adição de S9, não aumentou significativamente a atividade mutagênica (0,37 – 0,7 rev./µg de MOE e 2,4 – 5,6 rev./m³). Das amostras fracionadas, o extrato contendo as partículas mais finas (< 0,5 µm) foi o mais mutagênico. Os resultados com a linhagem TA98/1,8-DNP₆ sugerem uma insignificante contribuição de nitrocompostos na mutagenicidade do ar destas amostras. Em conclusão, este trabalho sugere que o risco potencial de câncer

associado às partículas de ar está relacionado com a inalação de partículas finas ($< 2,5 \mu\text{m}$), que contem maior quantidade de mutágenos/carcinógenos.

Claxton et al. (2001), analisaram o potencial mutagênico de amostras de material particulado de ar ($\text{MP}_{2,5}$) coletadas na cidade de Boise, Idaho nos Estados Unidos. Os extratos orgânicos foram obtidos com DCM e testados por meio do ensaio *Salmonella*/microsoma em microsuspendência com as linhagens TA98 e TA100. Todas as amostras apresentaram atividade mutagênica com a linhagem TA98 na presença de S9 (14 - 217,6 rev./ m^3). A linhagem TA100 na presença (0 - 408,6 rev./ m^3) e ausência de S9 (0 - 98,1 rev./ m^3), juntamente com a TA98 sem S9 (0 - 131,3 rev./ m^3), apresentaram alguns sítios negativos. Este trabalho demonstrou que a cidade de Boise nos Estados Unidos apresentou maior mutagenicidade nas amostras estudadas na adição de ativação metabólica.

2.2.2 Mutagenicidade detectada em amostras de material particulado de ar no Brasil

2.2.2.1 Mutagenicidade detectada no Rio Grande do Sul

Vargas et al. (1998), avaliaram amostras de Partículas Totais em Suspensão (PTS) coletadas em 4 diferentes áreas urbanas na cidade Porto de Alegre no verão de 1994, por meio do ensaio *Salmonella*/microsoma com o método de pré-incubação com as linhagens TA98, TA98NR e TA98/1,8DNP₆. Os extratos foram obtidos por ultrasonicação, sequencialmente extraídos de acordo com a polaridade, com ciclohexano (CX) e DCM, respectivamente. Mutagenicidade elevada foi observada nas frações que continham os compostos moderadamente polares, com decréscimo após ativação metabólica. Os valores de revertentes por m^3 foram mais

altos nos locais de intenso tráfego de veículos na ausência de S9 (TA98: 9,56 rev./m³) e na presença de S9 (TA98: 5,08 rev./m³). Os autores concluíram que a resposta com as linhagens TA98NR e TA98/1,8DNP₆ demonstraram a atividade de mono e dinitroarenos nas amostras estudadas.

Em 2003, Ducatti e Vargas, analisaram a atividade mutagênica de extratos orgânicos de PTS nas mesmas áreas urbanas na cidade de Porto Alegre que Vargas et al. (1998), em diferentes estações do ano (primavera e verão de 1997/1998), por meio do protocolo em microssuspensão (TA98, TA98NR e TA98/1,8DNP₆) na ausência de S9. Os extratos também foram obtidos por ultrasonicação, extraídos sequencialmente com ciclohexano (CX) e DCM. Uma resposta positiva de mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura foi observada para os compostos moderadamente polares (DCM) e não polares (CX) nas diferentes áreas. As respostas variaram de acordo com as diferentes estações do ano e os maiores valores da atividade mutagênica foram geralmente observados nas áreas de intenso tráfego de veículos, na primavera para os compostos moderadamente polares (TA98: 5,32 rev./μg de MOE) e no verão para não polar (TA98: 0,97 rev./μg de MOE). As respostas observadas com as linhagens TA98NR e TA98/1,8DNP₆ também demonstraram a contribuição dos compostos mono e dinitroarenos na mutagenicidade observada.

De acordo com Vargas (2003), de janeiro a agosto de 2000 foi realizado um estudo piloto para investigar a atividade mutagênica do PTS coletado em diferentes áreas (uma mistura de área industrial, rural e urbana) que sofrem influência de um complexo petroquímico em Porto Alegre. Os extratos obtidos com DCM foram testados frente ao ensaio *Salmonella*/microssoma em microssuspensão com a linhagem TA98 na ausência e presença de S9. Na ausência de S9, os resultados obtidos variaram entre 1,0 e 19,2 rev./μg de MOE e entre 0,9 e 21,2 rev./m³. Na presença de S9, a relação foi similar, mas com diminuição de mutagenicidade (dados não apresentados). O estudo também analisou a concentração de PTS no ar e concluiu que não houve relação entre a concentração de PTS e a atividade mutagênica detectada.

Coronas et al. (2008), avaliaram a mutagenicidade de PTS e MP₁₀ em Triunfo, uma cidade que sofre influência de emissões petroquímicas. Os extratos foram

obtidos por ultrasonicação com DCM e o ensaio *Salmonella*/microsoma em microssuspensão foi realizado com a linhagem TA98 e suas derivadas, TA98NR e TA98/1,8DNP₆ ou YG1021 e YG1024 (YG1021 e YG1024 – superexpressando nitroredutase e *O*-acetiltransferase, respectivamente). As menores partículas (MP₁₀) apresentaram maior mutagenicidade e os valores obtidos para PTS foram de 0,5 – 2,8 e 0,2 – 1,5 rev./µg de MOE na ausência e presença de ativação metabólica, respectivamente. Todas as amostras apresentaram atividade mutagênica com compostos que causam deslocamento do quadro de leitura e a resposta para as linhagens sensíveis aos nitrocompostos indicou uma significativa contribuição de nitro, amino e/ou hidroxilaminas derivadas de HPA para a mutagenicidade total dos extratos estudados.

Coronas et al. (2009), investigaram os efeitos genotóxicos em pessoas que residem ou trabalham próximo a uma refinaria de petróleo em Canoas e avaliaram a atividade mutagênica do MP₁₀. Pensando em um ambiente de exposição, amostras de sangue periférico e células da mucosa bucal foram avaliadas por meio do ensaio cometa e micronúcleo, respectivamente. O material orgânico foi extraído por ultrasonicação com DCM e analisado por meio do ensaio em microssuspensão com as linhagens TA98, YG1021 e YG1024. O grupo exposto mostrou danos no DNA significativamente mais alto do que o grupo controle, mas a frequência de micronúcleos foi muito baixa em ambos os grupos. Todos os extratos orgânicos apresentaram resposta mutagênica positiva (TA98: 2,2 a 11,7 rev./µg de MOE) e, de forma geral, os efeitos diminuíram na presença de S9 (TA98: 2,5 a 9,2 rev./µg de MOE), indicando que os compostos predominantes foram os mutágenos de ação direta. A resposta com as linhagens YG indicou que nitroarenos e/ou aminas aromáticas estavam presentes nos extratos de MP₁₀. Este trabalho demonstrou a presença de mutagenicidade em amostras de MP₁₀ sob a influência de uma refinaria de petróleo e que moradores e/ou trabalhadores desta área apresentam um aumento nos danos de DNA, que não estão associados com outros fatores.

Pereira et al. (2010), avaliaram e compararam a atividade mutagênica atmosférica em duas áreas urbanas (Montenegro e Santo Antônio da Patrulha), sob maior ou menor influência de fontes antropogênicas, respectivamente. Os extratos orgânicos foram obtidos por ultrasonicação com DCM, testados frente ao protocolo em microssuspensão (TA100, TA98, YG1021 e YG1024) e os HPA de interesse

foram quantificados por CLAE. A mutagenicidade detectada na cidade de Montenegro para a linhagem TA98 foi de 1 - 4 e de 1 – 5,2 rev./ μ g de MOE na ausência e presença de S9, respectivamente. Os compostos encontrados em maior concentração nesta área foram o benzo[ghi]pirileno (BghiP) e indeno[1,2,3-cd]pireno (IP), podendo estar relacionados à emissões veiculares. Para Santo Antonio da Patrulha, BghiP e IP também estavam presentes em grande quantidade em relação aos outros compostos, porém em concentração bem menor do que em Montenegro e a resposta mutagênica obtida foi de 0,7 - 1,3 rev./ μ g de MOE na ausência e de 0,6 - 3,7 rev./ μ g de MOE na presença de S9. Uma elevada resposta foi observada com as linhagens específicas para compostos do grupo nitro e a alta resposta mutagênica obtida para TA98 na ausência de S9 em alguns períodos indicaram a presença de nitrocompostos. Os autores concluíram que ambos, HPA e compostos nitroaromáticos, provavelmente contribuíram para a mutagenicidade detectada nestas partículas de ar.

2.2.2.2 Mutagenicidade detectada em São Paulo

Sato et al. (1995), avaliaram a mutagenicidade do material particulado de ar (PTS) de duas diferentes áreas urbanas de São Paulo e da área industrial de Cubatão. O material orgânico de amostras sazonais foi extraído com DCM por ultrasonicação e testado frente ao ensaio *Salmonella*/microsoma pelo método de incorporação em placas com as linhagens TA98, TA100, TA98NR e TA98/1,8DNP₆. A mutagenicidade detectada na área urbana de São Paulo (12-246 rev./m³) foi muito maior do que a área industrial de Cubatão (5-33 rev./m³) e similar às cidades mais urbanizadas do mundo, onde as emissões veiculares são as maiores fontes de poluição. Todas as amostras da região metropolitana de São Paulo apresentaram atividade mutagênica com a linhagem TA98 na ausência (0,3 a 5,6 rev./ μ g de MOE) e na presença de S9 (0,3 – 7,4 rev./ μ g de MOE) sendo na maioria dos casos, maior ou similar do que a TA100 (ND – 7,2 rev./ μ g de MOE). Em virtude da adição de S9

não ter modificado significativamente a resposta mutagênica, os autores concluíram que há prevalência de mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura de ação direta. Os resultados obtidos com as linhagens TA98NR e TA98/1,8DNP₆ demonstraram que a presença de mononitro- e dinitroarenos contribuíram para a mutagenicidade destas amostras. Uma variação sazonal foi observada com altos níveis de mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura durante a primavera em São Paulo e verão em Cubatão. Durante o inverno, respostas mais significante foram encontradas com a TA100 na presença de S9, que sugere a presença de HPA não substituídos nestas amostras.

Ainda em 1995, Sato analisou estas mesmas amostras com a utilização do protocolo em microssuspensão com a linhagem TA98. As amostras de Cubatão variaram entre 9,8 e 54,4 rev./μg de MOE na ausência e entre 4,1 e 15,3 rev./μg de MOE na presença de S9. Parque Dom Pedro apresentou variação de 2,3 a 46,9 rev./μg de MOE e de 3,2 a 11,7 rev./μg de MOE na ausência e presença de S9, respectivamente. Para Pinheiros os valores observados foram entre 4,8 e 42,2 rev./μg de MOE na ausência de S9 e na presença foram entre 1,4 e 8,3 rev./μg de MOE. Os autores concluíram que a mutagenicidade específica dos extratos orgânicos no ensaio *Salmonella*/microsossoma em microssuspensão foi mais elevada na primavera e verão nas três áreas de estudo. Foi observada redução na mutagenicidade de todas as amostras na adição de ativação metabólica. Todos os extratos apresentaram atividade mutagênica, com predominância de mutágenos de ação direta que causam deslocamento do quadro de leitura.

De Martinis et al. (1999), realizaram análises químicas e teste *Salmonella*/microsossoma em microssuspensão (TA98) para avaliar amostras fracionadas de MP₁₀ coletadas em São Paulo. Os extratos orgânicos foram obtidos por equipamento Soxhlet com DCM e DCM seguido por acetona (ACE) e foram fracionados com eluição final em solventes orgânicos aumentando a sua polaridade. Análise qualitativa dos compostos foi realizada por Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massa (CG/EM). As frações DCM apresentaram atividade mutagênica (8,5 – 368 rev./μg de MP) quase 4 vezes maior do que as frações do extrato DCM/ACE (2 – 215,8 rev./μg de MP). A maioria da atividade mutagênica esteve concentrada nas frações moderadamente polares para ambos os extratos. A fração mais mutagênica dos extratos DCM continha cetonas, aldeídos e quinolinas e

dos extratos ACE, cetonas, ácidos carboxílicos e aldeídos. Em geral, a adição de S9 resultou em aumento da mutagenicidade das frações DCM (8 – 408 rev./μg de MP) que apresenta os compostos moderadamente polares e neutros, enquanto um decréscimo foi observado para os extratos DCM/ACE (2,6 – 117,4 rev./μg de MP) que continha os compostos mais polares. Estes resultados demonstram as diferenças que podem existir nos resultados de mutagenicidade entre as misturas complexas e amostras fracionadas devido a possíveis interações entre os compostos existentes.

2.3 Mutagenicidade detectada com as combinações seletivas utilizadas no estudo

Neste item foram abordados os trabalhos que utilizaram no mínimo uma das combinações seletivas apresentadas neste estudo. No final do capítulo, um resumo da mutagenicidade detectada com estas linhagens foi apresentado nas tabelas 4, 5 e 6.

2.3.1 Detecção da mutagenicidade com o par YG1041/TA98

Em virtude da linhagem TA98 ser derivada da linhagem TA1538, possui as mesmas características que sua parental, como a mutação *hisD3052* no operon da histidina que codifica para a enzima histidinol desidrogenase, de forma a detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura. Mutágenos com esta característica podem estabilizar o pareamento modificado que frequentemente

ocorre em sequências repetidas ou “*hot spots*” do DNA, resultando em mutações que causam deslocamento do quadro de leitura que restauram a estrutura de leitura correta para a síntese da histidina. A mutação *hisD3052* tem a sequência -CGCGCGC- de 8 resíduos repetitivos de GC próximo ao sítio de uma mutação que causa deslocamento do quadro de leitura (-1) no gene *hisD*. Possui ainda alterações que aumentam a sensibilidade das linhagens na detecção dos mutágenos, como mutação *rfa* – causa perda parcial da camada de lipopolissacarídeos (LPS) que compõe a membrana externa bacteriana e aumenta a permeabilidade a moléculas grandes que normalmente não penetrariam na célula bacteriana. Outra mutação é a deleção do gene *uvrB* que codifica um sistema de reparo por excisão no DNA livre de erros. Por razões técnicas, a deleção do gene *uvrB* se estende até o gene *bio* e como consequência, estas bactérias também requerem biotina para o crescimento (MARON; AMES, 1983).

A linhagem TA98 é a mais utilizada na maioria dos trabalhos de mutagenicidade em virtude de ser considerada mais sensível do que sua parental (TA1538) para a detecção de uma grande quantidade de compostos. Esta sensibilidade ocorre porque a TA98, juntamente com sua derivada YG1041 (HAGIWARA et al., 1993) apresentam o plasmídeo pKM101, que carrega o gene *mucAB* aumentando a mutagenicidade espontânea e induzida, pois aumenta o sistema de reparo no DNA suscetível ao erro, denominado “*error-prone*”, que normalmente está presente neste organismo. Este plasmídeo confere a estas linhagens a resistência ao antibiótico ampicilina (MARON; AMES, 1983).

A linhagem YG1041 foi construída em 1993 por Hagiwara et al., é derivada da linhagem TA98 com o diferencial da adição de um novo plasmídeo (pYG233) que lhe confere resistência também à canamicina e fornece elevados níveis das enzimas nitroredutases (NR) e *O*-acetiltransferases (OAT). A enzima NR foi demonstrada como um fator limitante para a ativação metabólica de nitroarenos mutagênicos em *S. typhimurium* (WATANABE; ISHIDATE JR; NOHMI, 1989), enquanto a acetiltransferase (AT) é uma enzima chave para a ativação intracelular de nitroarenos e aminas aromáticas (WATANABE; ISHIDATE JR; NOHMI, 1990). Os nitroarenos e aminas aromáticas são compostos químicos largamente distribuídos no ambiente, de potencial mutagênico e carcinogênico reconhecido. Requerem conversão metabólica intra e/ou extracelular para se tornarem mutagênicos a

bactéria. Esse grupo de nitrocompostos é metabolicamente ativado à arilhidroxilaminas através da redução de seu grupo funcional, pela ação das nitroredutases. As arilhidroxilaminas resultantes são então esterificadas pela acetil-CoA: N-hidroxiarilamina-O-acetiltransferase, a qual está presente também na célula bacteriana (WATANABE; ISHIDATE JR; NOHMI, 1989; 1990). Desta forma, a linhagem YG1041 de *S. typhimurium* com superprodução das enzimas é mais sensíveis na detecção destes compostos.

Com o método de pré-incubação de 20 minutos, Hagiwara et al. (1993), avaliaram a sensibilidade da linhagem YG1041 em relação sua parental TA98 frente a 13 compostos de estruturas diferentes, entre eles nitrocompostos, arilhidroxilaminas e aminas aromáticas (Tabela 1). A linhagem YG1041 foi extremamente mais sensível aos nitroaromáticos que requerem ambas as atividades, NR e AT para sua mutagenicidade máxima (grupo 1). Foi sensível também aos compostos arilhidroxilaminas e aminas aromáticas que necessitam apenas da ativação da O-AT para a mutagênese (grupo 2). O grupo 3 não apresentou diferenças de mutagenicidade entre as linhagens, sugerindo que por conter estruturas químicas muito diferentes não necessitam da ativação por NR e nem AT. Assim esta linhagem apresenta sensibilidade diferente aos compostos dos grupos nitro-, hidroxilamino- e das amino-aromáticas.

Tabela 1 – Potência mutagênica de 13 compostos químicos com o par YG1041/TA98 de *S. typhimurium*

Compostos	Revertentes induzidas (<i>his</i> ⁺) por µg			Principais grupos de compostos	
	S9 mix	TA98	YG1041		
Grupo 1					
2-Nitrofluoreno (2-NF)	-	142	248.260	Nitro compostos, exceto para N-OH-AAF	Maior mutagenicidade com a YG1041
2,6-Dinitrotolueno (2,6-DNT)	-	33	39.461		
1-Nitropireno (1-NP)	-	1.834	653.688		
N-OH-AAF*	-	8	1.088		
Nitro-Glu-P-1*	-	4.925	677.605		
Grupo 2					
N-Hidroxi-Glu-P-1 (N-OH-Glu-P-1)	-	5.827	366.392	Arlhidroxilaminas, compostos nitrosos ou aminas aromáticas, exceto 1,8-DNP	Maior mutagenicidade com a YG1041
2-Acetilaminofluoreno (2-AAF)	+	72	17.022		
2-Aminofluoreno (2-AF)	+	359	31.641		
1,8-Dinitropireno (1,8-DNP)	-	730.627	28.891.380		
Glu-P-1*	+	78.218	660.829		
Grupo 3					
m-Fenilenediamina (m-PDA)	+	37	37	Algumas aminas aromáticas (m-PDA e Trp-P) e derivados de benzo[a]antraceno	Respostas iguais
Trp-P-2*	+	53.264	46.436		
7,12-Dimetilbenz[a]antraceno (DMBA)	+	8	0,4		

Fonte: HAGIWARA et al., 1993

Notas: N-Hidroxi-2-acetilaminofluoreno (N-OH-AAF); 2-Amino-6-metildipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol (Glu-P-1); 3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indol (Trp-P-2)

Azuma et al. (1997), avaliaram a sensibilidade de algumas linhagens, entre elas a YG1041 em relação a TA98, comparando a sensibilidade dos métodos em microssuspensão e de pré-incubação de 20 minutos. As amostras utilizadas foram coletadas no Japão em ambiente externo (amostrador HI-VOL) e de ambiente interno (Amostrador de baixo-volume) e extraídas por ultrasonicação com DCM. A linhagem YG1041 (19 rev./µg de MOE) mostrou alta sensibilidade com o ensaio em microssuspensão, sendo 12 vezes maior do que a TA98 (1,6 rev./µg de MOE) sem ativação metabólica. Com a adição de S9, a sensibilidade da YG1041 (4,7 rev./µg de MOE) foi 5 vezes alta do que a TA98. Um excelente coeficiente de correlação foi obtido entre as atividades específicas das linhagens YG1041 e TA98 na ausência (0,889) e na presença (0,798) de S9. A sensibilidade do ensaio em microssuspensão utilizando a linhagem YG1041 foi aproximadamente 200 e 60 vezes maior do que o método de pré-incubação de 20 minutos utilizando a TA98 na ausência e presença

de ativação metabólica, respectivamente. Os resultados sugerem que a linhagem YG1041 e o método de microssuspensão são capazes de mensurar, com grande eficiência, a mutagenicidade de material particulado de ambientes externos e internos.

Em 1999, Dobiás et al., avaliaram o potencial mutagênico de uma amostra fracionada utilizando estudos de ADEB por meio do ensaio *Salmonella*/microssoma com o método de incorporação em placas (linhagens TA98, TA100 e YG1041). As amostras foram coletadas com amostrador HI-VOL próximo a um forno de uma coqueria na República Eslováquia (Kosice), o extrato bruto foi preparado por ultrasonicação com DCM, fracionado (ácida, básica e neutra), sub-fracionado (alifática, aromático, leve, moderado e altamente polares) por cromatografia em coluna de sílica-gel e as análises químicas (HPA e nitro-HPA) foram realizadas por CG/EM. Da mutagenicidade total, 20,4% estava na fração básica, 25,4% na fração ácida e 54,2% na fração neutra, demonstrando que os compostos contidos na fração neutra são mais importantes para o potencial mutagênico das misturas complexas de ar oriundas do processo de coqueria estudado. A mutagenicidade desta fração foi significativamente aumentada na linhagem YG1041 (78 e 90 rev./ μg de MOE) em comparação com a linhagem TA98 (não significativo e 15 rev./ μg de MOE), na ausência e presença de S9, respectivamente, demonstrando a presença de nitro-HPA. As sub-frações da fração neutra, a alifática não contribuíram para o efeito genotóxico da mistura. As frações aromáticas, alta e moderadamente polares demonstraram um pequeno papel, e a sub-fração levemente polar foi a que mais contribui para a mutagenicidade das substâncias químicas orgânicas na fração neutra das amostras providas do forno de coqueria. O efeito dos mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura (54% - TA98) nestas amostras foi mais importante para a mutagenicidade total destas frações do que o impacto dos mutágenos que agem por substituição de pares de bases (TA100). Em geral, 90% do potencial mutagênico destas três frações foram revelados após ativação metabólica (S9), indicando a presença dos HPA, mas o aumento na mutagenicidade direta e indireta com a linhagem YG1041, em comparação com a TA98, pode ser indicativo da presença de nitro-HPA. Na análise dos HPA, os compostos fluoranteno (10,9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MOE), criseno (8,9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MOE) e benzo[a]antraceno (8,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MOE) foram encontrados em maior quantidade no extrato bruto. Em relação aos

nitro-HPA, 3-nitrofenantreno (66 ng/mg de MOE) e 1-NP (27 ng/mg de MOE) foram detectados na fração neutra.

Cerná et al. (1999), avaliaram amostras de MP₁₀ coletadas em 4 cidades da República Tcheca (cidades de grande e pequena poluição industrial) durante um período de 13 meses por meio do ensaio *Salmonella*/microsoma em microsuspendição com a utilização das linhagens TA98 e YG1041. O objetivo principal foi indicar a linhagem mais apropriada para o monitoramento da mutagenicidade do material particulado de ar. Os extratos foram obtidos por ultrassonicação com DCM e a concentração de HPA foi determinada por CG/EM. Os extratos obtidos apresentaram altas respostas mutagênicas e um decréscimo da potência mutagênica foi observado na presença de S9 para ambas as linhagens na maioria das amostras. A maior mutagenicidade detectada foi observada para a YG1041 sem (30 a 568 rev./μg de MOE) e com S9 (negativo a 322 rev./μg de MOE). A linhagem TA98 apresentou valores entre negativo a 14,5 rev./μg de MOE, tanto na ausência quanto na presença de S9. Os resultados da análise de HPA tiveram uma pequena correlação apenas com a linhagem YG1041 para os compostos fenantreno, fluoranteno, pireno, criseno e benzo[ghi]pirileno ($r=0,3 - 0,4$). Diferenças sazonais foram encontradas na potência mutagênica entre as amostras do verão e do inverno, onde o nível de HPA foi aproximadamente 5 vezes maior durante o inverno. Em virtude do declínio na mutagenicidade observada com a YG1041 na presença de S9 em amostras coletadas no verão, os autores supõem que o nível de nitroderivados é maior neste período, provavelmente devido ao aumento de foto-ativação de HPA e formação de nitroderivados. Em conclusão, os autores recomendam a utilização da linhagem YG1041 para o monitoramento da mutagenicidade do ar, pois demonstrou sua potência mutagênica sendo 45 vezes maior do que sua parental TA98 e a adição de S9 não é necessária.

Andrade (2004) observou um aumento na concentração de material particulado (MP₁₀), na atividade mutagênica e no nível de HPA na atmosfera durante um período de colheita de cana de açúcar comparado a outro período sem a colheita na cidade de Araraquara – SP, utilizando o método de incorporação em placas com a linhagem YG1024 que superexpressa a enzima O-AT. Desta forma, Umbuzeiro et al., (2008a) resolveram avaliar a atividade mutagênica do extrato total e de frações (HPA, nitro-HPA e oxi-HPA) do material particulado de ar (MP₁₀) das cidades de

Araraquara e Piracicaba, durante a estação de colheita de cana de açúcar utilizando o ensaio *Salmonella*/microsossoma em microssuspensão com as linhagens TA98 e YG1041. Uma amostra da área metropolitana de São Paulo foi incluída para comparação. O extrato total foi obtido por equipamento Soxhlet com DCM e o fracionamento por CLAE com coluna de sílica. A mutagenicidade do extrato orgânico total para as amostras coletadas durante a colheita variou entre 55 e 320 rev./m³ para TA98 sem S9 e de negativo a 57 rev./m³ com S9. Para a cidade de São Paulo, 88 rev./m³ foram observados para a TA98 sem S9 e 19 rev./m³ com S9. Um elevado aumento na atividade mutagênica foi observado na comparação com a YG1041 (>95%) e o decréscimo da resposta com S9 indicam a presença dos nitroaromáticos como os maiores contribuidores para a mutagenicidade detectada. Em relação às frações, foi possível concluir que as frações nitro e oxi foram as mais potentes, onde cada uma representa aproximadamente metade da atividade mutagênica detectada com a YG1041 na ausência de S9.

Umbuzeiro et al. (2008b), estudaram a atividade mutagênica e a habilidade para a formação de adutos de DNA após exposição ao material particulado (PTS) extraído e fracionado. As amostras foram coletadas na cidade de São Paulo, em área próxima a uma grande avenida (Cerqueira Cesar) com intenso tráfego de veículos e em um parque (Ibirapuera) situado no meio da cidade. A extração foi obtida por Soxhlet com DCM, o MOE foi fracionado (HPA, nitro e oxi-HPA) por CLAE e as frações foram testadas por meio do ensaio *Salmonella*/microsossoma em microssuspensão com as linhagens TA98 e YG1041. A formação dos adutos *in vitro* foi avaliada com as frações nitro-HPA e oxi-HPA por incubação de DNA de timo de bezerro com adequada ativação para os nitroarenos (enzima citosólica hepática de rato) e análise por método ³²P-*postlabeling*. O nível total de adutos produzido pela fração nitro-HPA foi similar para ambas as amostras (30-45 adutos por 10⁸ nucleotídeos normais) produzindo zonas radioativas diagonais de supostos adutos de DNA aromáticos nas placas de camada delgada. Em contraste, o DNA ligado às frações oxi-HPA ativadas foram três vezes maiores e o padrão de adutos consistiu de múltiplos pontos distintos ao longo da linha diagonal nas placas. De qualquer forma, o nível de adutos não foi significativamente diferente entre os locais de amostragens para as duas frações. Em relação a mutagenicidade, a fração HPA de ambos os sítios apresentaram atividade mutagênica insignificante em ambas as

linhagens. A fração mais potente para o ensaio de mutagenicidade foi a fração nitro-HPA, onde a maior atividade mutagênica foi encontrada para a linhagem YG1041 sem S9 (25 rev./ μg de MP) em ambos os locais, a qual foi reduzida para 2,7 (Cerqueira César) e 4,4 (Ibirapuera) rev./ μg de MP na adição de S9. A linhagem TA98 apresentou baixa mutagenicidade para ambas as frações, variando de negativo a 0,7 rev./ μg de MP. O decréscimo da mutagenicidade com S9 na fração nitro-HPA e o fato da mutagenicidade aumentada com a YG1041 em relação a TA98 são indicativos de que os compostos que estão causando o efeito observado são os nitroaromáticos.

Franco et al., (2011) avaliaram quimicamente e toxicologicamente as frações nitro-HPA e oxi-HPA de extratos orgânicos de MP_{10} coletados na cidade de São Paulo (inverno de 2004). A extração foi realizada por equipamento Soxhlet com DCM e os extratos foram separados por CLAE utilizando os solventes hexano e DCM. A análise química foi realizada por CG/EM e a análise da mutagenicidade por meio do *Salmonella*/microsoma em microssuspensão com as linhagens TA98 e YG1041. Alguns nitro-HPA emitidos por exaustão veicular foram quantificados, como o 3-nitrofluoranteno, provavelmente co-eluído com o 2-nitrofluoranteno, um poluente secundário, apresentou níveis mais elevados (média: 0,16 ng/m^3 ; concentração máxima: 0,26 ng/m^3) que o 1-NP (média: 0,031 ng/m^3 ; concentração máxima: 0,054 ng/m^3). O 6-nitrocriseno não foi encontrado em níveis detectáveis. Oxi-HPA não foram detectados provavelmente porque apresentaram concentrações muito baixas. Ambas as frações, nitro-HPA e oxi-HPA apresentaram respostas mutagênicas semelhantes, do tipo deslocamento do quadro de leitura, com potencial maior na ausência de S9, indicando a prevalência de mutágenos diretos. As respostas observadas para a linhagem YG1041 (59 a 1200 rev./ μg de MOE) foram significativamente maiores que para a TA98 (2,4 a 28 rev./ μg de MOE) sugerindo a presença de compostos nitroaromáticos. Os autores concluíram que a fração oxi-HPA, contendo os compostos mais polares do que a fração nitro, deveria ser composta por radicais oxi- e/ou hidroxil- que podem ser mais mutagênicos do que os compostos da fração nitro. Em virtude da não detecção de oxi-HPA através da análise química, é difícil sugerir que estes compostos estejam presentes nestas amostras coletadas e a resposta obtida com o ensaio de mutagenicidade indicou a presença de moléculas contendo radical nitro-.

2.3.2 Detecção da mutagenicidade com o par YG5161/TA1538

Entre todas as linhagens utilizadas neste trabalho, a construída mais recentemente é a YG5161 (MATSUI et al., 2006). Derivada da linhagem TA1538 possui as mesmas características que sua parental como mutação *hisD3052* no *operon* da histidina, mutação *rfa*, deleção do gene *uvrB* e do gene *bio*. A linhagem YG5161 possui como diferencial a presença do plasmídeo pYG768 carregando o gene *dinB* que superexpressa a enzima DNA polimerase IV da enterobactéria *Escherichia coli* (*E. coli*), em aproximadamente 10-20 vezes a mais (25.000-50.000 moléculas por célula) do que o nível de expressão normal.

Considerando que o processo de replicação do DNA é altamente correto permitindo apenas 1 erro em aproximadamente 10^9 - 10^{10} eventos de incorporação, esta baixa frequência pode ser aumentada quando há modificação da molécula do substrato através de agentes endógenos ou exógenos que causam dano no DNA ou ainda através da modulação da fidelidade de replicação na ausência de qualquer dano. É sabido também que a exposição das células a condições adversas como agentes genotóxicos ou ao envelhecimento, leva a ativação do sistema SOS, como consequência, à indução de algumas proteínas que estão envolvidas com reparo de DNA, recombinação e/ou mutagênese. Esta indução conta com um número restrito de proteínas, entre elas a RecA, UmuD, UmuC e DinB que são elementos chave para a resposta SOS (WAGNER et al., 1999).

Sabendo que o sistema SOS é um importante processo utilizado pela maioria das bactérias, na tentativa de sobreviver aos efeitos letais do DNA muito danificado, Kokubo et al. (2005), interromperam alguns genes (*polB_{ST}*, *dinB_{ST}*, *umuDC_{ST}* e *samAB_{ST}*) na linhagem TA1538 da *S. typhimurium* que codificam enzimas DNA polimerases induzidas pela resposta SOS. Os autores concluíram que diferentes DNA polimerases são engajadas para contornar os diferentes tipos de lesões, como as geradas na linhagem TA1538 (sequência CGCGCGCG) e este fenômeno depende do mutágeno em contato com o DNA.

Em decorrência deste achado, Matsui et al. (2006), construíram algumas linhagens isogênicas derivadas da linhagem TA1538 com a introdução de plasmídeos, dentre estes, carregando os genes *dinB* (pYG768) ou *umuDC* que codificam as enzimas DNA polimerase IV (linhagem YG5161) e DNA polimerase V, respectivamente, e avaliaram sua resposta para 30 compostos por meio do ensaio *Salmonella*/microssoma com pré-incubação de 20 minutos (Tabela 2). Em virtude da DNA polimerase V ser homóloga à DNA polimerase RI, o plasmídeo utilizado foi o pKM101, sendo desta forma, a avaliação baseada na linhagem TA98 que já possui este plasmídeo. Os compostos testados foram divididos em 4 grupos de acordo com o resultado de mutagenicidade obtido. Os compostos pertencentes ao grupo 1 (BaP e seus derivados, 3-metilcolantreno, 1-AA e 2-AA) apresentaram maior mutagenicidade com a linhagem YG5161 (gene *dinB*) que superexpressa a DNA Polimerase IV, demonstrando a eficiência desta enzima em contornar as lesões geradas por este grupo de compostos na sequência CGCGCGCG. A DNA Polimerase IV é conhecida por contornar adutos de DNA formados em guaninas modificadas por compostos policíclicos aromáticos, levando a deleção de dois pares de bases e conseqüentemente, ao deslocamento do quadro de leitura. O grupo 2 inclui cinco compostos (derivados de HPA e um agente alquilante) que possuem alta mutagenicidade para ambas as linhagens YG5161 e TA98, sugerindo que as lesões ocasionadas por estes compostos podem ser contornadas por qualquer uma das duas DNA polimerases com similar eficiência. O grupo 3 inclui alguns compostos (nitrocompostos, alguns HPA e derivados e compostos estruturalmente diferentes) que apresentam maior mutagenicidade com a linhagem TA98, demonstrando que estes tipos de lesões são mais eficientemente contornados pela DNA Polimerase RI. A característica do grupo 4 (aminas aromáticas e 4-NQO) é que a introdução de qualquer um dos plasmídeos codificando as DNA polimerases IV ou RI não aumentou a mutagenicidade destes compostos, sugerindo que outra enzima como, por exemplo, a enzima replicativa DNA polimerase III, seja responsável por corrigir este tipo de lesão. O estudo concluiu que as enzimas DNA polimerase IV e DNA polimerase RI tem distintos, mas de certa forma, coincidem especificidade em contornar algumas lesões levando ao deslocamento do quadro de leitura. Os resultados sugerem uma interessante possibilidade de utilização da linhagem YG5161 como uma linhagem superior na detecção de HPA não substituídos ambientais.

Tabela 2 – Potência mutagênica de 30 compostos com as linhagens TA1538, TA98 e YG5161 de *S. typhimurium*

Compostos	Revertentes induzidas (<i>his</i> ⁺) por µg				Principais grupos de compostos	
	S9 Mix	TA1538	TA98	YG5161		
Grupo 1						
Benzo[a]pireno-7,8-diidroepoxido	-	44	113	776	Derivados de Benzo[a]pireno exceto para 3-metilcolantreno, 1-AA e 2-AA	Maior mutagenicidade com a linhagem YG5161
Benzo[a]pireno diol epoxido	-	420	920	3620		
10-Azabenz[a]pireno	+	9	12	68		
Benzo[a]pireno	+	15	30	104		
3-Nitro-benzo[a]pireno	-	316	1244	2580		
3-Metilcolantreno	+	10	23	65		
1-Aminoantraceno (1AA)	+	8	7	25		
2-Aminoantraceno (2AA)	+	540	564	1102		
Grupo 2						
7,12-Dimetilbenz[a]antraceno (DMBA)	+	7	17	23	Derivados de HPA, exceto para ENNG	Mutagenicidade de igual entre a TA98 e YG5161
6-Aminocriseno	+	1200	4693	5955		
1-Nitro-benzo[a]pireno	-	524	1640	2896		
Benzo[a]pireno-4,5-diidroepoxido	-	2724	4836	4900		
ENNG*	-	3	58	60		
Grupo 3						
1-Nitropireno	-	154	2354	194	Alguns nitro-compostos; alguns HPA e compostos estruturalmente não relacionados como furilfuramida, aflatoxina B1 e acridina laranja	Maior mutagenicidade com a TA98
1,8-Dinitropireno	-	110100	708300	171600		
6-Nitro-benzo[a]pireno	-	24	268	58		
1-Nitro-6-azabenz[a]pireno	-	60500	178180	58020		
3-Nitro-6-azabenz[a]pireno	-	3560	57650	5240		
Fulilfuramida	-	480	5760	620		
Aflatoxina B1	+	990	6680	1160		
Benzo[a]pireno-7,8-tetraidroepoxido	-	1332	3404	2252		
Acridina Laranja	+	113	234	131		
Benz[a]antraceno	+	1	10	2		
2-Nitrofluoreno	-	162	341	215		
Grupo 4						
PBTA-1*	+	5074	4568	4720	Aminas aromáticas, exceto para 4-NQO	Mutagenicidade igual para as três linhagens
Glu-P-1*	+	52800	61120	56640		
Aminofenilnorarman	+	12352	8880	11456		
N-OH-AAF ⁺	-	62	76	52		
4-Nitroquinolina-1-oxido (4NQO)	-	1150	1470	1180		
2-Acetilaminofluoreno	+	114	124	105		

Fonte: MATSUI et al., 2006.

Notas: N-Etil-N-nitro-nitrosoguanidina (ENNG); 2-[2-(Acetilamino)-4-[bis-(2-metoxi-etil)amino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol (PBTA-1); 2-Amino-6-metildipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol (Glu-P-1); N-Hidroxiacetilaminofluoreno (N-OH-AAF)

Até o momento, o único trabalho que utilizou a nova linhagem YG5161 foi de Sharma et al. (2007). Eles avaliaram a mutagenicidade de extratos brutos

(hexano:cetona) e de três frações (não polar, moderadamente polar e polar) de material particulado de ar (MP_{2,5}) com o ensaio *Salmonella*/microsoma em microssuspensão com as linhagens TA98, YG1041 e YG5161. As amostras foram provenientes de 4 ambientes diferentes (urbanos e de incineração) da Dinamarca e análises químicas foram realizadas por CLAE com detecção por fluorescência para identificação de HPA. Os HPA analisados e quantificados foram benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[g,h,i]pirileno, benzo[k]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno, indeno[1,2,3-cd]pireno e o BaP (2,9 a 47 ng/mg de MP), como o mais abundante nos 4 locais. Todos os locais apresentaram mutagenicidade, mas as amostras provenientes do incinerador foram menos mutagênicas. A fração não polar não apresentou mutagenicidade com nenhuma das linhagens. Na fração moderadamente polar a resposta mutagênica foi fracamente observada somente com S9 (negativo a 0,087 rev./μg de MP), provavelmente devido a presença dos HPA não substituídos. Na fração polar e no extrato bruto, alta mutagenicidade foi observada na ausência de ativação metabólica, devido ao fato de que esta fração contém os nitro-HPA que não requerem ativação metabólica. Passível de comparação ao presente estudo, a mutagenicidade do extrato bruto para a linhagem TA98 foi de negativo a 0,41 rev./μg de MP sem S9 e de negativo a 0,23 rev./μg de MP com S9. A linhagem YG1041 apresentou mutagenicidade de 0,19 a 0,6 e negativo a 0,31 rev./μg de MP, na ausência e presença de S9, respectivamente. Por último, a linhagem YG5161 apresentou valores de 0,07 a 0,16 rev./μg de MP na ausência de S9 e de negativo a 0,1 rev./μg de MP na presença de S9. Entre as linhagens utilizadas, a YG1041 obteve altas respostas em relação a TA98 e YG5161 sugerindo a importância dos nitroarenos e aminas aromáticas para a atividade mutagênica. Embora os HPA não substituídos tenham sido detectados por análise química, de forma geral, a linhagem YG5161 não apresentou mais revertentes do que a TA98, sugerindo que estes compostos não contribuem fortemente para a atividade mutagênica detectada.

2.3.3 Detecção da mutagenicidade com o par YG7108/TA1535

As linhagens TA1535 e YG7108 pertencem ao único par de linhagens utilizado neste trabalho que detecta mutágenos que causam substituição de pares de bases. Ambas possuem a mutação *hisG46* no gene *hisG* que codifica a primeira enzima da biosíntese da histidina. Esta mutação resulta da substituição de uma leucina (GAG) por uma prolina (GGG) (MARON; AMES, 1983). Além disso, como as linhagens anteriores, possuem características que aumentam sua sensibilidade como a mutação *rfa* e as deleções dos genes *uvrB* e *bio*. O diferencial da linhagem YG7108 em relação a sua parental TA1535 é a maior sensibilidade na detecção de compostos do grupo dos agentes alquilantes, devido à deleção de genes (*ada_{ST}* e *ogt_{ST}*) envolvidos com o mecanismo responsável pelo reparo (alquiltransferência) do DNA danificado por estes compostos (YAMADA et al., 1997).

No caso de lesões no DNA geradas por agentes metilantes, um pequeno produto de alquilação - *O*⁶-Metilguanina (*O*⁶-MeG) é responsável pela maioria das mutações induzidas. Esta base alterada gera a incorporação de uma timina ou citosina, sem bloquear a replicação do DNA, resultando em mutações de transição (GC para AT). Para neutralizar os efeitos mutagênicos, a maioria dos organismos possui enzimas (*O*⁶-Metilguanina DNA Transferases) que diretamente transferem o grupo metil provindo da *O*⁶-MeG para um resíduo de cisteína dentro da proteína em um processo auto-inativador. Os genes *ada* e *ogt* estão envolvidos na produção de *O*⁶-Metilguanina DNA Transferases, na qual o gene *ada* codifica Metiltransferases que transferem o grupo metil de *O*⁶-MeG e de *O*⁴-Metiltimina (*O*⁴-MeT) tão bem quanto de estéreisômeros de metilfosfotriesteres e a proteína Ogt repara *O*⁶-MeG e *O*⁴-MeT, mas não metilfosfotriesteres e pode reparar *O*⁶-etilguanina no DNA em uma taxa mais alta do que a proteína Ada. Por isso, Yamada et al. (1995), construíram linhagens com deleção dos genes *ada_{ST}* (YG7100), *ogt_{ST}* (YG7104) e de ambos (YG7108) e avaliaram a sensibilidade das linhagens com os mutágenos *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (MNNG), *N*-etil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (ENNG), *N*-propil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (PNNG) e *N*-butil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (BNNG) por meio do ensaio *Salmonella*/microsoma com pré-incubação de 20 minutos. Os

genes foram interrompidos pelo método de pré-ligação, onde fragmentos de DNA carregando os genes de resistência aos antibióticos inseridos entre as regiões de divisa cromossômicas do gene *ogt_{ST}* ou *ada_{ST}* foram concatêmerizados através de ligação (T4 DNA ligase) antes da introdução na TA1535 de *S. typhimurium* por eletroporação. As linhagens YG7104 e YG7108 se mostraram mais sensíveis à ação mutagênica de nitrosoguanidinas com cadeias carbono alquil de vários tamanhos, enquanto que a deleção somente do gene *ada_{ST}* (YG7100) exibiu sensibilidade apenas para o efeito assassino de metil nitrosoguanidina. Estes resultados sugeriram que as linhagens YG7104 e YG7108 podem ser utilizadas na eficiente detecção destes mutágenos ambientais, os agentes alquilantes.

Em 1997, este mesmo grupo (YAMADA et al.) examinou a sensibilidade das linhagens YG7104 e YG7108 a 11 mutágenos incluindo agentes alquilantes e não alquilantes com o ensaio *Salmonella*/microsoma com pré-incubação de 20 minutos. A linhagem YG7108 apresentou maior sensibilidade para a maioria dos compostos testados, principalmente aos agentes metilantes e o resultado desta mutagenicidade em comparação com a linhagem parental TA1535 pode ser conferido na tabela 3.

Tabela 3 – Potência mutagênica de 11 compostos com o par TA1535/YG7108 de *S. typhimurium*

Compostos	Revertentes induzidas (<i>his</i> ⁺) por µg			Grupos de compostos
	S9 mix	TA1535	YG7108	
<i>N</i> -Metil- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidina (MNNG)	-	415	26.116	Nitrosoguanidinas
<i>N</i> -etil- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidina (ENNG)	-	0,6	6398	
<i>N</i> -propil- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidina (PNNG)	-	497	21.760	
<i>N</i> -butil- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidina (BNNG)	-	328	6.979	
Metilnitrosouréia (MNU)	-	19	330	Nitrosouréias
Etilnitrosouréia (ENU)	-	3	79	
Metil metanosulfonato (MMS)	-	ND	69	Metanosulfonatos
Etil metanosulfonato (EMS)	-	ND	90	
Dimetilnitrosamina (DMN)	+	0,002	12	Nitrosaminas
Diethylnitrosamina (DEN)	+	ND	22	
1,2-dibromoetano (EDB)	-	245	452	

Fonte: YAMADA et al., 1997

Notas: ND - Não detectado

Nenhum trabalho foi encontrado na literatura relatando a mutagenicidade do material particulado de ar através da linhagem YG7108. O único trabalho encontrado que utilizou esta linhagem na avaliação de mutagenicidade de amostra ambiental foi grupo de Tsukatani et al. (2002), onde amostras de solo foram estudadas na cidade de Kurume no Japão. Os extratos orgânicos dos solos foram mutagênicos com as linhagens TA98, TA100, YG1041 e YG1042 com e sem S9, mas não apresentaram resposta mutagênica com a linhagem YG7108, indicando que os agentes alquilantes não parecem estar presentes nestas amostras em concentrações detectáveis pelo ensaio. Os resultados indicaram que as amostras de solo estudadas podem estar contaminadas com nitroarenos e aminas aromáticas.

Tabela 4 – Detecção da atividade mutagênica expressa em número de revertentes por µg de MOE observada em amostras de ar da literatura (continua)

Local	Solvente/Extração	Protocolo do ensaio	Revertentes/µg de MOE				Referência
			TA98-S9	TA98+S9	YG1041-S9	YG1041+S9	
OUTROS PAÍSES							
MATERIAL REFERÊNCIA (IPCS)							
Área urbana	DCM/Soxhlet	Microsuspensão	4,5	3,5	-	-	BAGLEY et al., 1992
Material particulado de diesel			66	68	-	-	
MATERIAL REFERÊNCIA (IPCS)							
Área urbana	DCM / Ultrasonicação	Microsuspensão	2	0,9	-	-	AGURELL; STENSMAN, 1992
Material particulado de diesel			14,1	25,8			
ITÁLIA							
Bréscia	DCM/Soxhlet	Microsuspensão	0,3 - 0,9	0,4 - 0,7	-	-	MONARCA et al., 1997
JAPÃO							
Shizuoka	DCM / Ultrasonicação	Microsuspensão	1,6	-	19,0	4,7	AZUMA et al., 1997
REPUBLICA ESLOVÁQUIA							
Kosice	DCM / Ultrasonicação	Incorporação em placas	Negativo	15	78	90	DOBIÁS et al., 1999
REPUBLICA TCHECA							
Plzen			2,3 - 7,5	1,5 - 6,3	96,0 - 278,0	52,0 - 157,0	CERNÁ et al., 1999
Usti nad Labem	DCM / Ultrasonicação	Microsuspensão	1,4 - 14,4	1,2 - 8,4	55,0 - 568,0	23,0 - 322,0	
Benesov			0,2 - 14,4	0,04 - 14,5	30,0 - 256,0	6,0 - 216,0	
Zd'ár nad Sázavou			1,6 - 10,3	0,9 - 6,4	52,0 - 405,0	37,0 - 179,0	

Tabela 4 – Detecção da atividade mutagênica expressa em número de revertentes por µg de MOE observada em amostras de ar da literatura (conclusão)

Local	Solvente/Extração	Protocolo do ensaio	Revertentes/µg de MOE				Referência
			TA98-S9	TA98+S9	YG1041-S9	YG1041+S9	
BRASIL							
RIO GRANDE DO SUL							
Porto Alegre	DCM / Ultrasonicação	Microsuspensão	0,4 - 5,32	-	-	-	DUCATTI; VARGAS, 2003
	CX / Ultrasonicação		0,8 - 0,97	-	-	-	
Pólo Petroquímico / Porto Alegre	DCM / Ultrasonicação	Microsuspensão	1 - 19,2	-	-	-	VARGAS, 2003
Triunfo	DCM / Ultrasonicação	Microsuspensão	0,5 - 2,8	0,2 - 1,5	-	-	CORONAS et al., 2008
Canoas	DCM / Ultrasonicação	Microsuspensão	2,2 - 11,7	2,5 - 9,2	-	-	CORONAS et al., 2009
Montenegro	DCM / Ultrasonicação	Microsuspensão	1 - 4	1 - 5,2	-	-	PEREIRA et al., 2010
Santo Antônio de Patrulha			0,7 - 1,3	0,6 - 3,7	-	-	
SÃO PAULO							
Região Metropolitana	DCM/Ultrasonicação	Incorporação em placas	0,3 - 4,6	0,3 - 5,7	-	-	SATO et al., 1995
Cubatão			0,4 - 5,6	0,3 - 7,4	-	-	
Região Metropolitana	DCM/Ultrasonicação	Microsuspensão	2,3 - 46,9	1,4 - 11,7	-	-	SATO, 1995
Cubatão			9,8 - 54,4	4,1 - 15,3	-	-	
São Paulo	DCM /Soxhlet	Microsuspensão	8,5 - 368	8 – 408	-	-	DE MARTINIS et al., 1999
	ACE /Soxhlet		2 - 216	2,6 - 117,4	-	-	
São Paulo	DCM/Soxhlet	Microsuspensão	2,4 - 28	1,1 - 9,6	59 - 1200	14 - 210	FRANCO et al., 2011

Notas: DCM – Diclorometano; CX – Ciclohexano; ACE – Acetona;
 - : Dados não disponíveis

Tabela 5 – Detecção da atividade mutagênica expressa em número de revertentes por m³ observada em amostras de ar da literatura (continua)

Local	Solvente/Extração	Protocolo do ensaio	Revertentes/ m³				Referência
			TA98-S9	TA98+S9	YG1041-S9	YG1041+S9	
OUTROS PAÍSES							
ESTADOS UNIDOS							
Martinez, CA		Microsuspensão	85 - 296	304 - 727	-	-	KADO et al., 1986; Dados de CLAXTON et al., 2001
Boise, Idaho		Microsuspensão	14 - 217,6	0 - 131,3	-	-	CLAXTON et al., 2001
ITÁLIA Brescia	DCM / Soxhlet	Microsuspensão	2 - 7,6	2,4 - 5,6	-	-	MONARCA et al., 1997
REPUBLICA TCHECA							
Plzen			6,5 - 314	3,6 – 368	341 - 7284	136 - 2952	
Usti nad Labem	DCM / Ultrasonicação	Microsuspensão	18,1 - 757	7,7 – 502	737 - 14008	287 - 4990	CERNÁ et al., 1999
Benesov			1,5 - 77,1	0,3 - 92,5	197 - 3607	38,6 - 1964	
Zd'ár nad Sázavou			7,9 - 72,4	3,6 - 43,0	367 - 7379	100 - 11193	
BRASIL							
RIO GRANDE DO SUL							
Porto Alegre	CX e DCM/ Ultrasonicação	Pré-incubação	9,6	5,1	-	-	VARGAS et al., 1998
Porto Alegre	DCM / Ultrasonicação	Microsuspensão	0,8 - 17,1	-	-	-	DUCATTI; VARGAS, 2003
	CX / Ultrasonicação		2,3 - 13	-	-	-	
Pólo Petroquímico / Porto Alegre	DCM / Ultrasonicação	Microsuspensão	0,9 - 21,2	-	-	-	VARGAS, 2003
Triunfo	DCM / Ultrasonicação	Microsuspensão	0,1 - 3	0,1 – 2	-	-	CORONAS et al., 2008
Canoas	DCM / Ultrasonicação	Microsuspensão	2,5 - 12,8	1,2 - 9,2	-	-	CORONAS et al., 2009

Tabela 5 – Detecção da atividade mutagênica expressa em número de revertentes por m³ observada em amostras de ar da literatura (conclusão)

Local	Solvente/Extração	Protocolo do ensaio	Revertentes/ m³				Referência
			TA98-S9	TA98+S9	YG1041-S9	YG1041+S9	
SÃO PAULO							
Araraquara - ARQ6	DCM / Soxhlet	Microsuspensão	170,0	32,0	-	-	UMBUZEIRO et al., 2008a
Araraquara - ARQ13			320,0	57,0	-	-	
Piracicaba - PRB9			55,0	14,0	-	-	
Piracicaba - PRB15			220,0	Negativo	-	-	
Região Metropolitana			88,0	19,0	-	-	
Região Metropolitana	DCM/Ultrasonicação	Incorporação em placas	2,9 - 55,2	2,4 - 68,3	-	-	SATO et al., 1995
Cubatão			1,7 - 24,3	1,3 – 32	-	-	
Região Metropolitana	DCM/Ultrasonicação	Microsuspensão	31 - 454	11 - 140	-	-	SATO, 1995
Cubatão			41,3 - 244,9	17,1 - 69,1	-	-	
São Paulo	DCM /Soxhlet	Microsuspensão	0,6 - 149	0,6 - 165	-	-	DE MARTINIS et al., 1999
	ACE /Soxhlet		1,4 - 29,5	0,1 – 16	-	-	

Notas: DCM – Diclorometano; CX – Ciclohexano; ACE – Acetona;

- : Dados não disponíveis

Tabela 6 – Detecção da atividade mutagênica expressa em número de revertentes por μg de material particulado (MP) observada em amostras de ar da literatura

Local	Solvente/Extração	Protocolo do ensaio	TA98-S9	Revertentes/µg de MP			Referência
				TA98+S9	YG1041-S9	YG1041+S9	
OUTROS PAÍSES							
DINAMARCA							
Copenhagen	Hexano/ACE/Extração Líquida pressurizada	Microsuspensão	0 - 0,41	0 - 0,23	0,18 - 0,6	0 - 0,31	SHARMA et al., 2007
BRASIL							
SÃO PAULO							
Av. Cerqueira César	DCM / Soxhlet	Microsuspensão	0 - 0,7	Negativo	0,9 - 25,3	0,5 - 2,72	UMBUZEIRO et al., 2008b
Parque do Ibirapuera	DCM / Soxhlet		0 - 0,4	0 - 0,2	0 - 25,1	0 - 6,8	
São Paulo	DCM /Soxhlet	Microsuspensão	8,5 - 368	2 - 215,8	-	-	DE MARTINIS et al., 1999
	ACE /Soxhlet		8 - 408	2,6 - 117,4	-	-	

Notas: MP - Material particulado; DCM – Diclorometano; ACE – Acetona;
 -: Dados não disponíveis

3. *Objetivos*

3 OBJETIVOS

Este trabalho visa verificar a aplicabilidade de combinações seletivas de linhagens *S. typhimurium* do ensaio *Salmonella*/microsoma em microssuspensão na caracterização da mutagenicidade de amostras de material particulado de ar coletado em uma cidade no interior de São Paulo (Limeira). Como objetivos específicos:

- Comparar os resultados de mutagenicidade das amostras de material particulado de ar, obtidos por meio do ensaio *Salmonella*/microsoma em microssuspensão, entre os pares seletivos de linhagens e verificar quais as possíveis classes de compostos orgânicos poderiam explicar o efeito observado, onde as respostas diferenciais com os pares indicam a presença de nitrocompostos e/ou aminas aromáticas (YG1041/TA98), de HPA não substituídos (YG5161/TA1538) e de agentes alquilantes (YG7108/TA1535) nas amostras testadas;
- Obter dados recentes sobre o potencial mutagênico do material particulado de ar de um local do estado de São Paulo que sofre influência de intenso tráfego, emissões industriais e da agricultura, incluindo o plantio de cana de açúcar, e comparar com resultados já publicados para outras localidades;
- Construir um perfil de mutagenicidade para as linhagens que apresentaram resultados positivos que pudesse auxiliar em estudos de ADEB, por meio da comparação dos resultados obtidos com as amostras de material particulado de ar e dos resultados de mutagenicidade para compostos puros provindos da literatura.

4. Material e Métodos

4.1 Amostragem

4.1.1 Caracterização da área de estudo

O município escolhido para o estudo foi o de Limeira, interior do estado de São Paulo, localizado a 154 km a noroeste da capital, pertence à Região Administrativa de Campinas e constitui-se na sede da Região de Governo que tem seu nome, e é integrada por 8 municípios: Araras, Leme, Limeira, Pirassununga, Cordeirópolis, Conchal, Santa Cruz da Conceição e Iracemápolis. A área do município possui um total de 581 km² divididos em: perímetro urbano com aproximadamente 143,14 km²; perímetro de expansão urbana com 35,84 km²; perímetros urbanos isolados de 2,8 km² e zona rural de 399,22 Km² (PREFEITURA MUNICIPAL DE LIMEIRA, 2010).

Limeira localiza-se na Depressão Periférica, onde predominam as colinas baixas, cujas cotas altimétricas oscilam entre 500 e 700 metros. A altitude média é de 567 m e o relevo apresenta colinas de forma suavizadas, separadas por vales e sem planícies aluviais importantes. Possui um clima temperado com inverno seco e temperatura média anual de 22°C (PREFEITURA MUNICIPAL DE LIMEIRA, 2010).

Com uma população estimada de 281.583 habitantes para o ano de 2009 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2010), a cidade contava com uma frota de aproximadamente 143.310 veículos, entre eles automóveis (64%), caminhões (3,2%), micro-ônibus (0,5%), motocicletas (20,5%), ônibus (0,4%) e outros (11,4%) (DEPARTAMENTO NACIONAL DE TRÂNSITO, 2010).

A cidade possui economia forte, baseada nos setores primários (citricultura e cana de açúcar), secundários (indústrias de transformação e de tecnologia

avançada) e terciários (mais de 3500 estabelecimentos comerciais e 3000 prestadoras de serviços) (PREFEITURA MUNICIPAL DE LIMEIRA, 2010). Em relação à produção de cana de açúcar, um levantamento publicado em abril de 2010 pelo Instituto de Economia Agrícola do Estado de São Paulo concluiu que no ano de 2009, aproximadamente 3% (12.263.996 ton.) da produção do estado de São Paulo foi de responsabilidade do município de Limeira (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, 2010).

4.1.2 Ponto de amostragem

O ponto de amostragem selecionado para a coleta do material particulado localiza-se no campus I da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) na Faculdade de Tecnologia (FT), situado na Av. Pascoal Marmo, 1888 – Jd. Nova Itália – Limeira – SP. O amostrador foi instalado ao lado do posto meteorológico (Longitude Oeste: 47°25'21", Latitude Sul: 22°33'45" e Altitude: 635,90 m) entre a avenida Cônego Manoel Alves e a rodovia Dep. Laércio Corte, área esta coberta por um intenso fluxo de veículos leves e pesados (Figura 1).

4.1.3 Preparação para coleta das amostras

O equipamento utilizado para a coleta das amostras de material particulado de ar foi o amostrador HI-VOL (ENERGÉTICA®), que coleta Partículas Totais em Suspensão (PTS), as partículas com diâmetro aerodinâmico entre 0,1 e 100 µm. O equipamento é composto principalmente por 3 partes: 1. Um amostrador propriamente dito (motor aspirador e porta-filtro); 2. Uma casinhola de abrigo; 3. Dispositivos auxiliares (Indicador de vazão, Programador de tempo – “timer”,

Regulador de tensão e horômetro). A figura 2 mostra detalhadamente todas as partes que compõe este equipamento.

Figura 2 - Esquema do amostrador HI-VOL (ENERGÉTICA®, 2009)

4.1.3.2 Calibração do amostrador HI-VOL

4.1.3.2.1 Procedimento para calibração

A calibração do amostrador foi realizada no local da amostragem no dia anterior a primeira coleta (06/05/2009), de acordo com as instruções do fabricante (ENERGÉTICA®, 2009). De forma resumida:

- A temperatura ambiente e a pressão atmosférica do local foram medidas;

- O teto e a porta da casinhola de abrigo foram abertas (figura 3). A tampa do porta-filtro foi substituída por placas adaptadoras (Kit de calibração). Os itens do kit de calibração estão esquematizados na figura 4;
- O manômetro em “U” foi instalado pendurado na frente da casinhola e foi conectado à tomada de pressão do copo de orifício de calibração, mediante mangueira de látex;
- Uma carta gráfica do registrador foi instalada e o amostrador foi ligado deixando funcioná-lo por 5 minutos para atingir equilíbrio térmico;
- A pena do registrador de vazão foi verificada mantendo-se no zero da carta e deu-se início ao levantamento dos valores da pressão manométrica e da deflexão na pena para as cinco placas de resistência (nº 18, 13, 10, 7 e 5);
- Foi registrado, no formulário, o dH (cm d’água) indicado no manômetro para cada uma das placas. O dH é a soma dos deslocamentos dos níveis em ambos os lados do manômetro;
- Antes de trocar a placa de resistência, com o auxílio de uma chave de fenda foi necessário girar a carta (cerca de 5 mm de traçado da pena) no sentido do ponteiro do relógio;
- Para a realização da troca das placas o motor foi desligado e observou-se se a pena havia retornado ao zero da carta. Após a troca para uma nova placa em sentido decrescente foi repetido o procedimento. A carta do registrador foi retirada e foram identificados os cinco patamares traçados pela pena com os números correspondentes às placas.

Figura 3 - Amostrador HI-VOL aberto no momento da calibração (cedida por GILBERTO DE ALMEIDA, 2010)

Figura 4 - Esquema dos itens do kit de calibração (ALMEIDA, 1999)

4.1.3.2.2 Cálculo e expressão dos resultados

Para o cálculo da curva de calibração foi necessário ter os valores de dH corrigidos para as condições de pressão e temperatura padrão através da equação abaixo:

$$\sqrt{dHc (p_2/P_p) (T_p/T_2)}$$

Onde:

dH – leitura do manômetro de coluna d'água;

P₂ – Pressão atmosférica medida na calibração (mmHg);

P_p – Pressão atmosférica padrão (560 mmHg);

T₂ – Temperatura medida na calibração (K);

T_p – Temperatura padrão (298 K).

Em seguida, a vazão na condição padrão (Q_p) foi calculada a partir da inclinação (a₁) e do intersepto (b₁) da reta de calibração do kit, obtida por regressão linear:

$$Q_p = \frac{1}{a_1} \left[dHc \left(\frac{P_2}{760} \right) \left(\frac{298}{T_2} \right) - b_1 \right]$$

Para cada placa, foi corrigido o valor da deflexão (D) da pena pela expressão:

$$\sqrt{D (P_2/P_p) (T_p/T_2)}$$

A curva de calibração do amostrador foi traçada plotando-se os valores calculados com a equação acima versus os valores de Q_p, ou calculando, por regressão linear, a inclinação (a₂) e a interseção (b₂) da reta dada por:

$$\sqrt{D (P_2/P_p) (T_p/T_2)} = a_2 Q_p + b_2$$

Após a determinação da relação de calibração, foi verificado se cada ponto estava dentro dos limites de linearidade ($\pm 5\%$). Isso foi realizado determinando um Y_{cal} (equação abaixo) para cada valor de Q_p .

$$\% \text{ diferença} = (Y - Y_{cal} / Y_{cal}) 100$$

Por último, a vazão Q_p nas amostragens foi dada pela equação:

$$Q_p = 1/a_2 [\sqrt{D(P_3/P_p) (T_p/T_3)} - b_2]$$

Onde:

Q_p – vazão volumétrica em condições padrão indicadas pelo kit (m^3 – padrão/min);

D – Deflexão da pena;

P_3 – Pressão barométrica média durante a amostragem (mmHg);

T_3 – Temperatura ambiente média durante a amostragem (K);

a_2 – Inclinação da reta de calibração do HI-VOL;

b_2 – Interseção da reta de calibração do HI-VOL.

4.1.3.3 Preparação dos filtros

Os filtros utilizados para a coleta do material particulado de ar foram de fibra de vidro (ENERGÉTICA[®]) com dimensões de 254 x 203 mm e poros com 0,33 μm de diâmetro. O filtro foi colocado em um dessecador com temperatura média de 25°C e umidade relativa inferior a 50%, por 24 horas. O filtro aberto foi pesado em uma balança (SHIMADZU AUW 220D) com sensibilidade de 0,1 mg, antes e após

cada amostragem. Guardou-se o filtro aberto em uma folha de papel almaço e envelope de papel para o transporte até o ponto de coleta.

4.1.4 Coleta das amostras

A coleta das amostras foi realizada pelos técnicos da Faculdade de Tecnologia da UNICAMP - Campus I - Limeira. Foram coletadas 6 amostras durante o período de maio e junho de 2009 e os dias de amostragem são apresentados na tabela 10 (Item 5.2 – Resultados).

O princípio do método consiste na aspiração do ar através do filtro, a uma vazão entre 1,13 e 1,70 m³/min. por um período contínuo de 24 horas. Partículas com diâmetro aerodinâmico entre 0,1 e 100 µm ficaram retidas no filtro e isto dependeu da velocidade e direção dos ventos. A concentração do material particulado total em suspensão em µg/m³ foi calculada determinando-se a massa do material coletado e o volume de ar amostrado.

Para a coleta foi necessário colocar (centralizado) um filtro novo preparado conforme o item 4.1.3.3, de forma que o lado rugoso ficasse para cima, diretamente sobre a tela de alumínio (Figura 5) do amostrador. O registrador de vazão foi preparado com uma nova carta gráfica e o “timer” programado conforme os horários de início e término da amostragem.

Após a medição, o filtro foi retirado colocando-o em um envelope de papel e levado ao laboratório, juntamente com a carta gráfica do registrador. O filtro foi pesado novamente (após a retirada de umidade por 24 horas) e a carta foi utilizada para posterior determinação do volume de ar amostrado.

Figura 5 - Amostrador HI-VOL com o filtro de fibra de vidro já colocado (cedida por GILBERTO DE ALMEIDA, 2010)

4.1.4.1 Cálculo do volume de ar

O volume de ar que passou através do filtro durante a coleta foi calculado integrando-se a curva da vazão registrada na carta gráfica ao longo da coleta. Desta forma, foi necessária a utilização da carta gráfica com o registro da amostragem, a curva de calibração do HI-VOL e o tempo decorrido da amostragem. Para a leitura da carta foi preciso dividir a curva em intervalos de duas horas e tomar a leitura da deflexão (D) para cada intervalo, calculando a média e a vazão (Q_p) a partir da curva de calibração do HI-VOL, graficamente ou pela equação de regressão:

$$Q_p = \frac{1}{a_2} \left[\sqrt{D \frac{P_2}{760} \left(\frac{298}{T_2} \right)} - b_2 \right]$$

Onde:

D – Deflexão média obtida na carta para o intervalo considerado;

P_2 – Pressão barométrica média durante a amostragem (mmHg);

P_p – Pressão padrão (760 mmHg);

T_p – Temperatura padrão (298 K);

T_2 – Temperatura ambiente média durante a amostragem (K);

a_2 – Inclinação da reta de calibração do HI-VOL;

b_2 – Interseção da reta de calibração do HI-VOL.

Com o cálculo de todas as vazões médias para cada intervalo, a vazão média para o tempo real de amostragem foi calculada e este valor foi multiplicado pelo tempo total de amostragem em minutos.

4.1.4.2 Determinação da quantidade e da concentração de material particulado

A quantidade do material particulado retido em cada filtro foi determinada pela diferença entre as duas pesagens (antes e após a coleta). Este valor foi dado com aproximações em miligramas (mg). Após o cálculo da quantidade de material particulado e do volume total do ar amostrado, a concentração das partículas totais em suspensão foi calculada dividindo-se a massa de partículas coletadas pelo volume de ar amostrado. Este valor é expresso em microgramas por metro cúbico ($\mu\text{g}/\text{m}^3$).

4.1.5 Extração dos compostos orgânicos

4.1.5.1 Procedimento de extração orgânica

A extração dos compostos orgânicos presentes nas 6 amostras de material particulado foi realizada juntamente com um branco para avaliar a qualidade da extração, e desta forma, garantir que os compostos mutagênicos encontrados são pertencentes às amostras. Este branco foi feito com um filtro limpo, ou seja, que não passou pela amostragem e o procedimento de extração foi o mesmo realizado com as amostras.

O procedimento foi realizado nos laboratórios da Faculdade de Tecnologia da UNICAMP – Limeira, pelo método de ultrasonicação utilizando DCM (JT BAKER, México) na proporção de 1 mL de solvente para cada mg de PTS, de acordo com Sato (1995).

Para a extração foi utilizado meio filtro (127x203 mm) de cada amostra e do branco. Os filtros foram cortados em pequenos pedaços e colocados em um béquer. Em seguida foi adicionado o volume de DCM na proporção acima descrita. O béquer então foi levado ao banho de ultrassom (UNIQUE USC 1400), e submetido por 10 minutos a 40 kHz, em temperatura ambiente. Após o término, o volume total do extrato foi transferido para um erlenmeyer e o procedimento foi repetido por mais duas vezes. O extrato obtido foi filtrado em membrana de teflon de fluoropore 0,5 µm (MILLIPORE®) para a retirada do material particulado, e posteriormente, concentrado em evaporador rotativo (Figura 6).

Figura 6 – Esquema da extração dos compostos orgânicos

4.1.5.2 Concentração dos extratos

Para a concentração dos extratos foi utilizado um evaporador rotativo (FISATOM mod. 801) com sistema de resfriamento. Os extratos foram evaporados e concentrados a aproximadamente 5 mL. Em seguida, transferidos quantitativamente para um tubo e o volume final foi ajustado para 10 mL com DCM. Os extratos assim obtidos foram subdivididos em cinco porções: 2 frascos contendo 3 mL, 1 frasco contendo 2 mL, 1 frasco com 1 mL para possíveis análises químicas e o restante foi utilizado para determinação do Material Orgânico Extraído (MOE). Os frascos com volume de 3 mL foram secos em fluxo de nitrogênio gasoso e armazenados a -20°C para posterior ensaio de mutagenicidade.

4.1.5.3 Determinação da quantidade de Material Orgânico Extraído (MOE)

Para a determinação do MOE foram moldados cadinhos em papel alumínio. Estes cadinhos foram secos em estufa a 105°C por 2 horas e em seguida, transferidos para um dessecador. A massa de cada cadinho foi medida em balança semi-micro-analítica (SHIMADZU AUW 220D) com sensibilidade de 0,01 mg. Para cada cadinho, foram transferidos 0,5 mL do extrato concentrado, e estes foram deixados em capela para a evaporação do solvente. Tanto as amostras quanto o branco foram determinados em duplicatas. O MOE foi determinado pela média das diferenças das massas iniciais e finais dos cadinhos e expresso em mg/mL.

4.1. 6 Ensaio *Salmonella*/microssoma

4.1.6.1 Preparação dos meios de cultura e soluções

Todas as soluções e os meios de cultura utilizados no ensaio de mutagenicidade e na confirmação dos genótipos das linhagens foram preparados conforme Maron e Ames (1983) e Mortelmans e Zeiger (2000), sendo apresentados de forma resumida a seguir. Todos os ensaios de mutagenicidade e a preparação das culturas permanentes foram realizados no laboratório de microbiologia do Centro Universitário SENAC – Campus Santo Amaro.

- Meio de Vogel Bonner (Sais VB) (50x)

Utilizado no preparo das placas de ágar mínimo

Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (CARLO ERBA, Rondano, MI, Italy)	10 g
Ácido cítrico monoidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (CARLO ERBA, Rondano, MI, Italy)	100 g
Fosfato de sódio e amônio ($\text{NaH}_2\text{N}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA)	175 g
Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) (CARLO ERBA, Rondano, MI, Italy)	500 g
Água destilada morna (50°C)	q.s.p. 1000 mL

Após a dissolução de todos os reagentes com auxílio de um agitador magnético, o meio foi distribuído em alíquotas de 20 mL e esterilizado por 30 minutos. Quando a solução esfriou, foi armazenada a 4°C no escuro.

- Solução de glicose 10%

Utilizada no preparo das placas de ágar mínimo

Glicose (MERCK, Darmstadt, Germany)	20 g
Água destilada	q.s.p. 200 mL

A glicose foi dissolvida em água, esterilizada por 20 minutos e estabilizada em banho-maria a 55°C.

- Solução de ágar

Utilizada no preparo das placas de ágar mínimo

Bacto Ágar (DIFCO - Becton Dickinson, USA)	15 g
Água destilada	930 mL

O bacto ágar foi dissolvido em água, esterilizado por 20 minutos e estabilizado em banho-maria a 55°C.

- Placas de ágar mínimo

Utilizadas no ensaio *Salmonella*/microsoma

Solução de glicose 10%	50 mL
Solução de ágar	930 mL
Meio Vogel Bonner (50x)	20 mL

As soluções foram homogeneizadas com auxílio de um agitador magnético. Volumes de 25 mL de ágar mínimo foram distribuídos em placas de petri de 90X15 mm (PLEION). Após a solidificação, as placas foram estocadas a 4°C.

- Solução de biotina/histidina (0,5 mM)

Utilizada no preparo do Ágar de superfície

D-Biotina (M.M. 247,3 g/mol) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA)	0,012 g
L-Histidina (M.M. 191,7 g/mol) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA)	0,010 g
Água destilada morna (50°C)	100 mL

Os reagentes foram dissolvidos em água e após esterilização em membrana filtrante 0,22 µm (MILLIPORE®), a solução foi estocada a 4°C.

- Ágar de superfície (Top Ágar) suplementado com biotina/histidina

Utilizado no ensaio *Salmonella*/microsoma

Bacto ágar (DIFCO - Becton Dickinson, USA)	6 g
Cloreto de sódio (NaCl) (MERCK, Darmstadt, Germany)	6 g
Água destilada	900 mL
Solução de biotina/histidina 0,5 mM	100 mL

O ágar e o cloreto de sódio foram dissolvidos em água. A solução de biotina/histidina foi adicionada e homogeneizada aos outros reagentes. Volumes de 200 mL foram distribuídos em frascos com tampa de rosca, submetidos à esterilização em autoclave por 30 minutos e estocados a 4°C.

- Caldo nutriente

Utilizado no ensaio *Salmonella*/microsoma

Caldo nutriente nº2 (OXOID, Basingstoke, Hampshire, England)	25 g
Água destilada	1000 mL

O caldo nutriente foi dissolvido em água. Volumes de 21 mL foram distribuídos em frascos com tampa de rosca, submetidos à esterilização em autoclave por 20 minutos e armazenados a 4°C.

- Mistura S9 (4% v/v)

Utilizada no ensaio *Salmonella*/microsoma

Cada 10 mL da mistura S9 foi preparada com a seguinte composição:

Fração S9	0,4 mL
Solução de sais	0,2 mL
Solução de glicose-6-fosfato 1M	0,05 mL
NADP 0,1M	0,4 mL
Tampão fosfato 0,2M (pH 7,4)	5,0 mL
Água destilada estéril	3,95 mL

Todas as soluções preparadas previamente foram adicionadas assepticamente a um frasco estéril, homogeneizadas e mantidas a 4°C mesmo durante seu uso. Após o ensaio a solução excedente foi descartada.

Para o preparo da mistura S9 utilizou-se as seguintes soluções:

a) Fração S9

Fração S9 (MOLTOX, USA)	1 frasco
Água destilada estéril	2,3 mL

Adquirida liofilizada e armazenada a -20°C, a fração S9 foi ressuspensa em água, no momento do ensaio.

b) Solução de sais (cloreto de magnésio (MgCl_2) 0,4 M: cloreto de potássio (KCl) 1,65 M)

Cloreto de magnésio (MgCl_2) (CARLO ERBA, Rondano, MI, Italy)	8,13 g
Cloreto de potássio (KCl) (MERCK, Darmstadt, Germany)	12,3 g
Água destilada	100 mL

Todos os reagentes foram dissolvidos em água. Após a esterilização em autoclave por 15 minutos a solução foi armazenada a 4°C.

c) Solução de glicose-6-fosfato 1 M

Glicose-6-fosfato (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA)	2,821 g
Água destilada	10 mL

A glicose-6-fosfato foi dissolvida em água, esterilizada por membrana filtrante de 0,22 μm (MILLIPORE®) e armazenada a -20°C.

d) Solução de NADP 0,1 M:

β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA)	0,7654 g
Água destilada	10 mL

O NADP foi dissolvido em água, esterilizado por membrana filtrante de 0,22 μm (MILLIPORE®) e armazenado a -20°C.

e) Tampão fosfato 0,2 M:

Solução A	81 mL
Solução B	19 mL

As soluções foram homogeneizadas e após a verificação do pH, foi necessário um ajuste para 7,4 com adição da solução A ou B. Após esterilização em autoclave, a solução foi estocada a temperatura ambiente.

Para o preparo do Tampão Fosfato 0,2M foram utilizadas as seguintes soluções:

Solução A

Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) (CARLO ERBA, Rondano, MI, Italy)	2,84 g
Água destilada	100 mL

Solução B

Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) (CARLO ERBA, Rondano, MI, Italy)	2,76 g
Água destilada	100 mL

- Placas de Ágar Nutriente

Utilizadas no ensaio *Salmonella*/microsoma e no preparo da cultura permanente

Caldo nutriente nº2 (OXOID, Basingstoke, Hampshire, England)	25 g
Bacto ágar (DIFCO, Becton Dickinson, USA)	15 g
Água destilada	1000 mL

Os reagentes foram dissolvidos em água. O meio foi esterilizado em autoclave por 20 minutos e estabilizado em banho-maria a 55°C. Volumes de 25 mL foram distribuídos em placas de petri estéreis de 90X15 mm (PLEION) e estocados a 4°C.

- Solução de biotina (0,01% m/v)

Utilizada no preparo de cultura permanente

D-Biotina (M.M. 247 g/mol) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA)	0,010 g
Água destilada	100 mL

A D-Biotina foi dissolvida em água, esterilizada por membrana filtrante 0,22 µm (MILLIPORE®) e estocada a 4°C.

- Solução de histidina (0,5% m/v)

Utilizada no preparo de cultura permanente

L-Histidina (M.M. 191,7 g/mol) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA)	0,5 g
Água destilada	100 mL

A L-Histidina foi dissolvida em água, esterilizada por membrana filtrante 0,22 μm (MILLIPORE[®]) e estocada a 4°C.

- Solução de Ampicilina (8 mg/mL)

Utilizada no preparo de cultura permanente

Ampicilina (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA)	0,08 g
Água destilada	10 mL

A ampicilina foi dissolvida em água, esterilizada por membrana filtrante de 0,22 μm (MILLIPORE[®]) e armazenada a 4°C em frasco escuro.

- Solução de Canamicina (8 mg/mL)

Utilizada no preparo de cultura permanente

Sulfato de canamicina (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA)	0,08 g
Água destilada	10 mL

O sulfato de canamicina foi dissolvido em água, esterilizado por membrana filtrante de 0,22 μm (MILLIPORE[®]) e armazenado a 4°C em frasco escuro.

- Solução de Cloranfenicol (8 mg/mL)

Utilizada no preparo de cultura permanente

Cloranfenicol (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA)	0,08 g
Água destilada	10 mL

O cloranfenicol foi dissolvido em água, esterilizado por membrana filtrante de 0,22 μm (MILLIPORE[®]) e armazenado a 4°C em frasco escuro.

- Ágar mínimo para preparo de culturas permanentes

O procedimento realizado procedeu conforme a preparo das placas de ágar mínimo, mas com adição de algumas substâncias (Tabela 7).

Tabela 7 - Substâncias adicionadas aos meios para a preparação das culturas permanentes

Substâncias	mg/Litro
D-Biotina	0,8
L-Histidina	40,0
Ampicilina	25,2
Sulfato de canamicina	25,2
Cloranfenicol	25,2

4.1.6.2 Esterilização e teste de esterilidade

Todos os meios de cultura e soluções utilizados neste trabalho foram esterilizados em autoclave (FANEM mod. 415) a 121°C (1 atm.) por tempo determinado de acordo com cada procedimento, exceto os casos que necessitaram de esterilização por membrana filtrante. A esterilização da vidraria foi feita em estufa de secagem e esterilização (FANEM mod. 315 SE) a 180°C, por 2 horas. Todas as placas de petri e pipetas descartáveis utilizadas foram adquiridas previamente esterilizadas por radiação gama- cobalto.

O teste de esterilidade foi realizado colocando os meios de cultura em estufa bacteriológica (MARCONI mod. MA032) a 37°C por pelo menos 12 horas, sendo descartadas as placas que apresentassem qualquer tipo de crescimento.

4.1.6.3 Lavagem de vidraria

Todos os materiais utilizados foram descontaminados em autoclave (FANEM mod. 415) a 121°C por 30 minutos e aqueles reutilizáveis foram lavados com detergente neutro, enxaguados várias vezes e mantidos em solução de ácido sulfúrico/ácido nítrico 30% (6:1 v/v) por 8 horas. Após esse período, o material foi enxaguado 8 a 10 vezes com água corrente e posteriormente lavado uma vez com

água destilada. Os materiais de vidro de volume não preciso foram secos em estufa (FANEM mod. 315 SE) a 170-180°C.

4.1.7 Ensaio *Salmonella*/microsoma em microsuspendão

É um ensaio bacteriano utilizado para identificação de substâncias que causam dano no DNA (MORTELMANS; ZEIGER, 2000), especialmente desenvolvido para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de bases do DNA. Empregam linhagens de *S. typhimurium* derivadas da linhagem parental LT2, auxotróficas para histidina (*his⁻*), ou seja, essas linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem a capacidade de síntese desse aminoácido, tornando assim, prototrófica para histidina (*his⁺*) (MARON; AMES, 1983).

O princípio do ensaio consiste na exposição das linhagens de *S. typhimurium* à amostra testada em placas de ágar mínimo suplementadas com traços de histidina e biotina, na presença e na ausência de um sistema de metabolização *in vitro* (mistura S9). A mistura S9 consiste de um homogenato de células de fígado de rato (*Sprague-Dawley*) pré-tratado com uma mistura bifênil policlorinada (AROCLOR 1254), utilizado para a indução de enzimas do sistema citocromo P450, acrescida de cofatores (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Para este estudo a mistura S9 foi preparada de acordo com Maron e Ames (1983) e com Mortelmans e Zeiger (2000), a 4% v/v e adição de cofatores. Após 66 horas de incubação, as colônias bacterianas contidas nas placas são contadas em um contador automático, ou manualmente.

A presença de mutágenos na amostra é avaliada pela comparação do número de colônias das placas teste (revertentes espontâneos e induzidos) em relação ao número de colônias das placas de controle negativo (revertentes espontâneos) como ilustrado na figura 7.

Figura 7 - Placas de ágar mínimo com colônias *his*⁺ de *S. typhimurium*. A placa da esquerda contém os revertentes espontâneos (Controle Negativo) e a placa da direita contém revertentes espontâneos mais induzidos (Placa Teste) (cedida por GISELA DE ARAGÃO UMBUZEIRO)

A detecção de diversos mutágenos ocorre porque as linhagens apresentam diferentes mutações no *operon* responsável pela biossíntese da histidina e apresentam algumas características genéticas adicionais que lhes conferem maior sensibilidade nesta detecção, como a deleção do gene *uvrB*, a mutação *rfa* e a deleção do gene da biotina (MARON; AMES, 1983). Algumas linhagens podem conter plasmídeos (pKM101, pYG233 e pYG768) ou deleções de genes de reparo (*ogt_{ST}* e *ada_{ST}*) que aumentam ainda mais a sensibilidade destas linhagens na detecção de determinados compostos e ainda funcionam como marcadores das linhagens auxiliando na confirmação dos genótipos.

Embora apenas este ensaio não seja capaz de identificar quais os contaminantes estejam presentes nas misturas complexas de amostras ambientais, a mutagenicidade total observada é um indicador de atividade genotóxica existente (UMBUZEIRO et al., 2004a). Além disso, a obtenção de uma resposta com as combinações seletivas de linhagens *S. typhimurium*, ou seja, sensíveis a diferentes

grupos químicos, pode auxiliar na identificação da classe dos compostos genotóxicos que possa representar a mistura.

4.1.7.1 Linhagens utilizadas no ensaio *Salmonella*/microsoma

As linhagens de *S. typhimurium* utilizadas no estudo foram os pares YG1041/TA98, YG5161/TA1538, e YG7108/TA1535. As linhagens TA98, TA1535 e TA1538 foram gentilmente fornecidas por Dr. Larry D. Claxton da “*Environmental Protection Agency* (USEPA)” e as linhagens YG1041, YG5161 e YG7108 por Dr. Takehiko Nohmi do “*National Institute of Health Sciences*” (Japão). As características genéticas de cada linhagem utilizada foram apresentadas de forma detalhada anteriormente (item 2.3 - revisão bibliográfica) e de forma resumida na tabela 8. Estas linhagens foram sistematicamente testadas quanto à presença destas características, através do procedimento denominado preparo da cultura permanente.

Tabela 8 - Genótipos e tipo de mutação preferencialmente detectado pelas linhagens de *S. typhimurium* utilizadas

Linhagem	Descrição	Tipo de mutação	Plasmídeo	Referências
TA1538	<i>hisD3052</i> , $\Delta(uvrB, bio)$, <i>rfa</i>	Deslocamento do quadro de leitura	-	MARON; AMES, 1983
TA98	<i>hisD3052</i> , $\Delta(uvrB, bio)$, <i>rfa</i> , Ap^r	Deslocamento do quadro de leitura	pKM101	MARON; AMES, 1983
YG1041	<i>hisD3052</i> , $\Delta(uvrB, bio)$, <i>rfa</i> , Ap^r e Cm^r , apresenta superprodução de NR e O-AT	Deslocamento do quadro de leitura	pKM101 pYG233	HAGIWARA et al., 1993
YG5161	<i>hisD3052</i> , $\Delta(uvrB, bio)$, <i>rfa</i> , Ap^r , apresenta superprodução de DNA Pol. IV	Deslocamento do quadro de leitura	pYG768	MATSUI et al., 2006
TA1535	<i>hisG46</i> , $\Delta(uvrB, bio)$, <i>rfa</i>	Substituição de pares de bases	-	MARON; AMES, 1983
YG7108	<i>hisG46</i> , $\Delta(uvrB, bio)$, <i>rfa</i> , Cm^r e Cn^r , $\Delta(ogt_{ST}$ e $ada_{ST})$	Substituição de pares de bases	-	YAMADA et al., 1995, 1997

Notas: *his* – mutação responsável pela síntese da histidina
 $\Delta uvrB$ – deleção do gene *uvrB*
 Δbio – deleção do gene da biotina
rfa – mutação que causa perda parcial da camada lipopolissacarídica
 Ap^r – ampicilina resistente
NR – nitroreduases
O-AT – O-acetiltransferase
DNA Pol. IV – DNA Polimerase IV
 Cm^r – Canamicina resistente

Δogt_{ST} e ada_{ST} – deleção dos genes responsáveis pela produção das enzimas O⁶-metilguanina DNA metiltransferases
 Cn^r – cloranfenicol resistente

4.1.7.2 Preparo da cultura permanente

Todas as linhagens de *S. typhimurium* foram armazenadas em freezer (NOVA ÉTICA mod. 415-DE155) a -70°C. As culturas para estoque foram distribuídas em ampolas (tubos criogênicos) com 0,9 mL de cultura e 0,1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) como agente crioprotetor. Para o uso rotineiro, as culturas foram distribuídas em microtubos tipo *eppendorf* com 0,18 mL de cultura e 0,02 mL de DMSO.

As culturas permanentes de todas as linhagens foram preparadas antes de iniciarmos a bateria de ensaios e as características genéticas de cada linhagem foram previamente avaliadas como descrito a seguir.

Uma alíquota (100 µL) de cultura permanente foi inoculada em 20 mL de caldo nutriente e, colocada sob agitação (Incubadora de bancada shaker - QUIMIS mod. Q816M20) (150 a 170 rpm) por 16 horas de incubação a 37°C ($\pm 0,5$). Aos frascos de caldo nutriente das linhagens que possuem resistência a algum antibiótico foram adicionados os antibióticos específicos para confirmação e seleção dos genótipos. As linhagens resistentes e seus respectivos antibióticos podem ser observados na tabela 8 do item 4.1.7.1. Após a incubação, a cultura foi estriada em placas de ágar nutriente para isolamento de colônias.

Após incubação das placas por aproximadamente 48 horas a 37°C, foram escolhidas ao acaso 5 colônias isoladas de cada linhagem, e estas, inoculadas em tubos de ensaio com 5 mL de caldo nutriente, uma a uma.

As linhagens selecionadas foram incubadas *overnight* sob agitação (150-170 rpm) a 37°C e após este período, as culturas foram distribuídas em microtubos com 10% de crioprotetor e armazenadas em freezer (ELETROLUX) (-20°C). Da mesma forma, foram preparadas culturas em tubos criogênicos e armazenadas no freezer (-20°C) por dois dias e, então, transferidos para freezer a -70°C até o momento do preparo de novas culturas.

Para a verificação e confirmação dos genótipos das linhagens, cada cultura crescida nos 5 mL de caldo nutriente foi inoculada através de zaragatoas esterilizadas em placas específicas para os testes conforme descrito abaixo. Após incubação a 37°C por 48 horas, os resultados foram analisados e as linhagens que não apresentaram resultados esperados foram descartadas.

- Auxotrofia para Histidina

Todas as culturas foram inoculadas em placas de ágar mínimo suplementada com biotina e ausência de histidina e em placas de ágar mínimo suplementada com biotina e histidina. Após a incubação, todas as linhagens deveriam crescer apenas

nas placas suplementadas com biotina e histidina demonstrando a sua auxotrofia ao aminoácido histidina (*his*).

- Mutação *rfa*

Foram colocados discos de papel de filtro com 5 mm de diâmetro embebido com 10 µL de solução cristal violeta 1% no centro da placa de ágar nutriente inoculada. Após incubação, as linhagens contendo esta mutação apresentavam um halo de inibição de no mínimo 12 mm de diâmetro ao redor do disco.

- Deleção *uvrB*

Metade de uma placa de ágar nutriente inoculada foi coberta com cartolina e irradiada com lâmpada germicida (ultravioleta 245 nm) de 15 watts a uma distância de 33 cm, por 15 segundos. Após incubação, verificou-se que as linhagens cresceram apenas na parte não irradiada (coberta) da placa.

- Plasmídeos pKM101 e pYG768

Com auxílio de uma alça de inoculação flambada foram aplicadas cinco linhas de solução de ampicilina 8 mg/mL na placa de ágar nutriente. Após a secagem, a linhagem a ser testada foi estriada sobre a linha de antibiótico. Após incubação, as linhagens contendo os plasmídeos de resistência apresentavam crescimento também sobre a linha de antibiótico.

- Plasmídeo pYG233

O procedimento é mesmo descrito para o plasmídeo pKM101 e pYG768, com a utilização da solução de sulfato de canamicina (8 mg/mL) como antibiótico.

- Deleção dos genes *ogt_{ST}* e *ada_{ST}*

A linhagem YG7108 possui resistência aos antibióticos sulfato de canamicina e cloranfenicol devido a deleção dos genes *ogt_{ST}* e *ada_{ST}*, respectivamente. O procedimento para a confirmação destas deleções é o mesmo descrito anteriormente, com a utilização de uma placa para a solução de canamicina e outra para a de cloranfenicol na concentração de 8 mg/mL.

- Taxa de reversão espontânea

A taxa de reversão espontânea foi avaliada inoculando-se 100 µL de cada cultura em 2 mL de ágar de superfície mantido em banho-seco a 45°C, e vertendo-se a mistura, após homogeneização, sobre uma placa de ágar mínimo. Cada cultura foi inoculada em duplicata.

A taxa de reversão espontânea foi avaliada após 48 horas de incubação a 37°C e deveria estar dentro da faixa esperada para cada linhagem.

Das 5 culturas analisadas de cada linhagem foi escolhida uma com características genéticas adequadas, e estas foram utilizadas para o preparo dos ensaios.

4.1.7.3 Procedimento do ensaio *Salmonella*/microsoma

A avaliação da atividade mutagênica dos extratos foi realizada utilizando o protocolo desenvolvido por Kado, Langley e Eisenstadt (1983), denominado *Salmonella*/microsoma em microssuspensão com modificações determinadas por DeMarini, Dallas e Lewtas (1989).

4.1.7.3.1 Protocolo do método em microssuspensão

Foram inoculados 100 µL de cultura das linhagens em 20 mL de caldo nutriente, utilizando-se os microtubos como fonte de inóculo. Após crescimento *overnight* a 37°C sob agitação mecânica (150-170 rpm), as culturas foram mantidas a 4°C até o momento do ensaio.

Os extratos obtidos de acordo com o item 4.1.5 foram diluídos em DMSO, de forma a se obter as doses de: 0,1; 1; 5; 10; 25 e 50 µg/MOE por placa. Em todos os ensaios foram realizados controles negativos e positivos. Como controle negativo foi utilizado o solvente DMSO. Para os controles positivos sem ativação metabólica foram utilizados 0,125 µg/placa de 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) para YG5161 e para TA98, 2,5 µg/placa de 4-nitro-o-diamino-fenilina (4NOP) para YG1041 e para TA1538, 5,0 µg/placa de Azida Sódica para TA1535 e 2,5 µg/placa para YG7108. Na presença de ativação metabólica foi utilizado 2-aminoantraceno (2AA) nas concentrações de 5,0 µg/placa para YG7108, 0,625 µg/placa para a TA98, TA1535, TA1538 e YG5161, e 0,03125 µg/placa para a YG1041.

Volumes de 5 µL de cada diluição, em duplicata, foram distribuídos em tubos de ensaio e misturados a 50 µL de suspensão da cultura bacteriana crescida “*overnight*” e concentrada 5X ($\sim 3 \times 10^9$ células/mL) e a 50 µL de Tampão Fosfato 0,015M (diluído 1:13 a partir do Tampão Fosfato 0,2M) ou a 50 µL da mistura S9, quando utilizado o sistema de ativação metabólica.

Essa solução foi homogeneizada e incubada a 37°C ($\pm 0,5$) por 90 minutos, sem agitação. Após esse tempo, foram adicionados 2 mL de ágar de superfície (suplementado com biotina/histidina), vertendo-se em placas de ágar mínimo. As placas foram incubadas invertidas, por 66 horas em temperatura de 37°C ($\pm 0,5$). O esquema (Figura 8) ilustra o procedimento do ensaio.

A quantificação do número de revertentes é feita pela contagem do número de colônias que cresceram em meio mínimo após 66 horas de incubação. O número de revertentes por placa foi contado com o auxílio de um contador de colônias mecânico (PHOENIX – CP602).

Figura 8 - Esquema do ensaio *Salmonella*/microsoma em micro-suspensão (modificado de KUMMROW, 2006)

4.1.7.3.2 Interpretação de resultados e análises estatísticas

Em todas as amostras, os ensaios foram realizados em experimentos de dose resposta e os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente. Ao tratarmos uma cultura bacteriana com doses crescentes de um agente ou mistura de compostos com atividade mutagênica, o número de revertentes por placa aumenta, proporcionalmente ao aumento das doses de exposição, até atingir um platô, no qual as doses aplicadas são letais para as células por causarem excesso de danos ao DNA ou, pela ação de outros compostos tóxicos presentes na amostra. Espera-se, portanto, uma relação dose resposta entre o número de revertentes por placa e as doses de uma amostra com atividade mutagênica.

A análise de variância (ANOVA) é aplicada para verificação de diferenças estatísticas entre o controle negativo e as doses utilizadas, seguida de regressão linear. A potência da amostra é expressa pela inclinação da parte linear da curva dose-resposta. A inclinação da reta é sempre proporcional à potência da amostra. Em geral, diferenças significativas entre doses testadas e o controle negativo, e relação dose-resposta comprovada estatisticamente indicam atividade genotóxica da amostra.

A Razão de Mutagenicidade (RM) nos mostra quantas vezes a média do número de revertentes em cada dose utilizada foi maior do que o controle negativo. Assim, o cálculo é feito através da razão entre o número de revertentes na placa teste (induzidos mais espontâneos) e o número de revertentes na placa controle (espontâneos) permitindo comparação dos resultados entre as diferentes linhagens utilizadas.

As amostras foram consideradas positivas quando a ANOVA e a dose resposta foram significativas ($p \leq 0,05$) e os valores de RM foram maiores ou iguais a 2. Foram considerados como resultados negativos os casos em que a ANOVA e/ou a dose resposta não foram significativos e ainda os valores de RM foram inferiores a 2 (UMBUZEIRO et al., 2004b).

Para as análises de variância e ajuste dos dados, foi utilizado o programa denominado SALANAL, elaborado por Dr. L. Myers do “*Integrated Laboratory*

Systems”, Carolina do Norte, EUA, e por ele também gentilmente cedido. A regressão linear foi avaliada utilizando uma variação do modelo linear, denominado truncagem tipo Bernstein (BERNSTEIN et al., 1982), que consiste na retirada de uma ou mais doses da análise usando somente os resultados que representam a porção linear da curva dose resposta, modelo contido no próprio programa SALANAL.

4.1.7.4 Validação das combinações seletivas de linhagens *S. typhimurium*

Para validar as combinações de linhagens utilizadas foram realizados alguns ensaios com compostos puros representativos das classes para as quais as linhagens são seletivas. Os ensaios foram realizados em duplicatas na presença de controles negativos e positivos de acordo com cada linhagem. O protocolo utilizado foi o mesmo descrito no item 4.1.7.3.

A validação do par YG1041/TA98 já havia sido estabelecida em nosso laboratório anteriormente por Franco et al. (2011) com o 1-NP – CAS 5522-43-0 (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, USA) representando o grupo dos nitrocompostos. Em virtude dos resultados positivos apresentados para as amostras de material particulado de ar testadas com as quatro linhagens (TA98, YG1041, TA1538 e YG5161), o presente estudo realizou apenas ensaios com o 1-NP frente ao par YG5161/TA1538 na ausência e presença de ativação metabólica. O 1-NP foi diluído em DMSO de forma a se obter as doses de 1, 5, 10, 25 e 50 ng/placa na ausência de S9 e na presença foram 10, 100, 500 e 1000 ng/placa.

A validação do par YG5161/TA1538 foi realizada com o BaP – CAS 50-32-8 (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, USA), representando os HPA não substituídos, em comparação com as linhagens YG1041/TA98, na presença de ativação metabólica. O BaP também foi diluído em DMSO e as doses utilizadas foram de: 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5 e 5 µg/placa para todas as linhagens.

Por último, o par YG7108/TA1535 foi validado com o agente alquilante Etilmetano sulfonato (EMS) - CAS 62-50-0 (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, USA) na ausência e presença de ativação metabólica. O EMS foi diluído em água ultra pura estéril e diluído para as doses de: 0,1; 1; 5; 10 e 25 µg/placa.

4.1.7.5 Comparação da mutagenicidade observada com dados da literatura

Para a comparação dos resultados de mutagenicidade observados neste estudo com dados apresentados na literatura para outras localidades, foi construído um gráfico onde alguns trabalhos foram selecionados, com a condição de que tivessem utilizado o mesmo protocolo de ensaio *Salmonella*/microsoma em microssuspensão com a linhagem TA98.

Para a segunda etapa, foram selecionados alguns trabalhos que utilizaram o ensaio *Salmonella*/microsoma para determinar a mutagenicidade de compostos puros, com o intuito de construir gráficos que apresentassem um perfil de mutagenicidade para cada uma das combinações seletivas das linhagens utilizadas que apresentaram resposta mutagênica. Os gráficos foram construídos a partir da razão entre as potências mutagênicas (número de revertentes por µg) observadas para os pares de linhagens (YG1041/TA98, YG5161/TA1538 e TA98/TA1538). Para os compostos que apresentaram mais de um dado para a mesma linhagem, antes da razão, foi calculada a média do número de revertentes entre todos os dados.

4.2 Ensaio Interlaboratorial

Os ensaios de mutagenicidade foram realizados no Centro Universitário SENAC. O referido laboratório participou do “2º Programa de Comparação Interlaboratorial para o teste *Salmonella*/microsoma – Teste de Ames”, promovida pela Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese

Ambiental (SBMCTA), onde vários laboratórios brasileiros fizeram as mesmas análises em um teste cego.

5 Resultados e Discussão

5.1 Condições climáticas

Já foi demonstrada a existência de uma variação sazonal na concentração dos compostos mutagênicos em extratos de material particulado de ar analisados nos estados de São Paulo (SATO, 1995) e Rio Grande do Sul (DUCATTI; VARGAS, 2003). O presente estudo foi realizado com amostras provenientes do outono de 2009, sendo apresentado por estes autores (SATO, 1995; DUCATTI; VARGAS, 2003) como uma das estações que registraram os menores índices de mutagenicidade. Com o objetivo de verificar se há alguma relação da mutagenicidade encontrada com a variação sazonal diária, obtivemos dados por meio de registros de uma estação meteorológica que fica situada ao lado do amostrador HI-VOL e estas informações podem ser acessadas pelo site da AgriTempo (SISTEMA DE MONITORAMENTO AGROMETEREOLÓGICO, 2010). Desta forma, a tabela 9 apresenta dados relativos às condições climáticas para a cidade de Limeira durante os dias em que foram realizadas as coletas das amostras, como a média diária de temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e de precipitação pluviométrica (mm).

Tabela 9 – Dados das condições climáticas nos dias de coleta das amostras do estudo

Amostras	Temperatura (°C)	Umidade Relativa do ar (%)	Precipitação (mm)
01	23,8	64	0
02	20,1	-	1,8
03	15,8	-	0,4
04	22,5	69	9,5
05	19,3	76,5	0
06	16,3	65,5	0

Fonte: SISTEMA DE MONITORAMENTO AGROMETEREOLÓGICO, 2010

Notas: -: Dados não disponíveis

É possível perceber que a temperatura variou de 15,8 a 23,8°C, onde a menor temperatura foi observada para a amostra nº 03 e a maior para a amostra nº 01. A umidade relativa do ar variou entre 64 e 76,5%. As amostras nº 02 e 03 não apresentaram estes dados disponíveis. Os índices de precipitação pluviométrica oscilaram entre 0 (amostras nº 01, 05 e 06) e 9,5 mm (amostra nº 04) de água. Não foram encontradas correlações entre as condições meteorológicas diárias e os dados de mutagenicidade.

5.2 Partículas Totais em Suspensão (PTS)

A tabela 10 apresenta os dados de caracterização das amostras (1 a 6) do estudo, como a data e o dia da semana em que foram realizadas as coletas, o volume de ar amostrado (m^3), a massa de material particulado retido em cada filtro (mg) e a concentração de PTS ($\mu\text{g}/\text{m}^3$). Esta concentração variou entre os dias de coleta, onde o maior valor observado foi para a amostra nº 01 (quinta-feira) alcançando o índice de 164,8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e o menor valor foi para a amostra nº 06 (quinta-feira) registrando o índice de 77,4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, não sendo identificado nenhum tipo de relação com os dias da semana.

Tabela 10 – Caracterização das amostras do estudo

Amostras	Data da coleta	Dia da semana	Volume de ar amostrado (m^3)	Material Particulado (mg)	PTS ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
01	07/05/2009	Quinta-feira	1998	329,3	164,8
02	10/05/2009	Domingo	1972	254,6	129,1
03	18/05/2009	Segunda-feira	1979	270,3	136,6
04	27/05/2009	Quarta-feira	2005	259,3	129,3
05	10/06/2009	Quarta-feira	2018	293,9	145,6
06	18/06/2009	Quinta-feira	2122	164,3	77,43

A figura 9 nos apresenta os valores de PTS observados para todas as amostras em comparação aos índices de padrão da qualidade do ar (primário e secundário) legislados pela Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 03/1990 e pela Portaria Normativa nº 348/1990 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). É possível observar que as concentrações de PTS coletadas nas amostras do estudo não ultrapassaram o padrão primário, que são entendidos como os níveis máximos toleráveis de concentração de poluentes atmosféricos que se ultrapassados poderão afetar a saúde da população. O padrão secundário foi ultrapassado apenas pela amostra de nº 01, desta forma, ultrapassando o nível desejado de concentração deste poluente, ao qual a partir deste valor é previsto a existência do mínimo efeito adverso sobre o bem estar da população, assim como o mínimo dano à fauna e à flora, aos materiais e ao meio ambiente em geral.

Figura 9 - Concentrações de PTS observadas para as amostras do estudo em comparação com os padrões primários e secundários da qualidade do ar

Embora nenhuma de nossas amostras tenha apresentado uma quantidade de PTS superior ao padrão primário ($240 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e a maioria (exceto amostra nº 01) não tenha ultrapassado o padrão secundário ($150 \mu\text{g}/\text{m}^3$), é possível observar com os resultados de mutagenicidade a seguir (item 5.4.2) que todas as amostras apresentaram resposta mutagênica com as linhagens de *S. typhimurium* que

detectam compostos que causam mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura, sendo elas a TA98, YG1041, TA1538 e YG5161. Essa observação também foi feita por Ducatti e Vargas (2003) que embora suas amostras tenham apresentado valores de PTS entre 17 e 161 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ as mesmas foram mutagênicas.

Tendo em vista que estes padrões foram criados para a avaliação da qualidade do ar, as amostras do estudo se enquadrariam nos índices bom (0-80 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) e regular (>80-240 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), no qual praticamente não há riscos à saúde ou no caso de índice regular, apenas pessoas de grupos sensíveis (crianças, idosos e pessoas com doenças respiratórias e cardíacas) podem apresentar sintomas como tosse seca e cansaço (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO – CETESB, 2011). No entanto, ao analisarmos os resultados de mutagenicidade (item 5.4.2) observados neste estudo é necessário fazermos uma reflexão de como estes valores foram criados e se são realmente seguros para a proteção à saúde e bem-estar da população, e aos danos à flora, à fauna e ao meio ambiente. Se trabalhos como este fossem utilizados no estabelecimento de padrões para a avaliação da qualidade de ar, talvez os novos valores apresentassem maior proteção à saúde da população.

5.3 Material Orgânico Extraído (MOE)

Na tabela 11 são apresentados os valores observados das concentrações de PTS ($\mu\text{g}/\text{m}^3$), bem como a concentração (mg/mL) e porcentagem (%) de MOE para cada amostra. A porcentagem de MOE variou de acordo com a amostra, sendo observada a maior porcentagem (21,6%) para a amostra nº 01 e a menor porcentagem (6,1%) para as amostras nº 04, 05 e 06. As concentrações de MOE oscilaram entre 0,5 e 3,6 mg/mL, observadas para as amostras nº 06 e 01, respectivamente.

Ducatti e Vargas (2003) através do mesmo protocolo observaram valores de MOE que variaram entre 1,9 e 23,5% para o estado de Rio Grande do Sul, sendo similar aos apresentados neste estudo (6,1 e 21%), o mesmo foi observado por Sato (1995) que obteve (1,9 a 13,4%) para amostras da Região Metropolitana de São Paulo e Cubatão.

Tabela 11 - Concentrações de PTS e de MOE das amostras do estudo

Amostras	PTS ^a (µg/m ³)	MOE ^b (mg/mL)	MOE (%)
1	164,8	3,6	21,6
2	129,1	1,8	14,2
3	136,6	0,9	6,7
4	129,3	0,8	6,1
5	145,6	0,9	6,1
6	77,43	0,5	6,1

Notas: a – Partículas Totais em Suspensão; b – Material Orgânico Extraído

5.4 Ensaio *Salmonella*/microsoma

5.4.1 Teste de genótipo das linhagens de *S. typhimurium*

Devido às características genéticas serem específicas das linhagens de *S. typhimurium* utilizadas no ensaio *Salmonella*/microsoma é necessário a realização de algumas análises para a confirmação da integridade das culturas preparadas. Dentre os testes realizados, foi avaliada a dependência do aminoácido histidina, decorrentes de diferentes mutações no *operon* histidina (*his*). A figura 10-A mostra uma placa de ágar mínimo suplementada com biotina e os números indicam as colônias testadas. É possível observar que na ausência do aminoácido histidina não houve crescimento em nenhuma das colônias. Já a figura 10-B mostra que houve

crescimento em quase todas as colônias nas placas de ágar mínimo suplementada com biotina e histidina. Todas as colônias das linhagens TA98, TA1538, YG5161 e YG7108 foram aprovadas neste teste. Da linhagem YG1041 foram reprovadas as colônias 1 e 3 por obter um pequeno crescimento também na placa suplementada apenas com biotina. Em relação à linhagem TA1535 a colônia 1 foi reprovada logo no início, pois não apresentou crescimento no tubo de ensaio com caldo nutriente, provavelmente devido alguma falha ocorrida no momento da transferência da placa de ágar nutriente com as colônias isoladas para o tubo com caldo nutriente.

Figura 10 - Placas de ágar mínimo suplementado com biotina (A) e com biotina e histidina (B) após o teste de auxotrofia para o aminoácido histidina (*his*)

Foram avaliadas também as alterações genéticas adicionais que lhes conferem maior sensibilidade na detecção a diversos mutágenos, tais como a deleção dos genes *uvrB* e a mutação *rfa*. A figura 11-A exemplifica com a linhagem TA1535 que as linhagens realmente não possuem a capacidade de reparo de excisão quando são expostas à luz ultravioleta. A parte da placa que houve crescimento das linhagens foi coberta durante a exposição. Nesta etapa todas as colônias testadas foram aprovadas. Na figura 11-B é possível observar um exemplo de dois halos de inibição (23 e 24 mm de diâmetro) formados após a incubação da placa inoculada com a cultura bacteriana e o disco de papel filtro embebido com

cristal violeta, comprovando a perda parcial da camada de LPS da membrana externa bacteriana, permitindo assim a passagem de cristal violeta e, conseqüentemente, impedindo o crescimento bacteriano ao redor do disco. A faixa dos valores dos diâmetros (mm) observados referente à medição dos halos de inibição para cada linhagem pode ser confirmada na tabela 12.

Figura 11 - Placas de ágar nutriente após os testes de deleção do gene *uvrB* (A) e de presença da mutação *rfa* (B)

Tabela 12 – Faixa dos resultados observados para os testes de confirmação dos genótipos (mutação *rfa* e reversão espontânea)

	TA98	YG1041	TA1538	YG5161	TA1535	YG7108
Diâmetro (mm) dos halos de inibição	21-23	22-24	23-26	12-14	22-24	22-24
Média do número de revertentes espontâneos na ausência de S9	34-41	81-153	15-19	18-22	17-28	35-47
Média do número de revertentes espontâneos na presença de S9	41-46	115-156	14-19	22-29	22-31	39-50

A taxa de reversão espontânea das linhagens foi realizada para avaliar a integridade de cada linhagem. Ainda na tabela 12 podemos observar quais foram as

médias observadas do número de revertentes espontâneos para cada linhagem na ausência e na presença de S9.

Algumas linhagens (TA98, YG1041 e YG5161) possuem plasmídeos que além de conferir resistência aos antibióticos, que é um conveniente marcador do plasmídeo, possuem diferenciais que podem auxiliar na detecção a diferentes mutágenos (MARON; AMES; 1983; MORTELMANS; ZEIGER; 2000). Um exemplo é a inserção de algumas cópias de genes específicos gerando uma superprodução de enzimas, como é o caso das NR e O-AT, que favorecerão a bioativação de nitrocompostos, tornando a linhagem YG1041 mais sensível em sua detecção a este grupo de compostos. Outras ainda possuem deleções de alguns genes, como é o exemplo da YG7108 que não apresenta os genes de reparo *ogt_{ST}* e *ada_{ST}*, aumentando sua sensibilidade na detecção de determinados compostos (agentes alquilantes) e lhes conferem resistência a alguns antibióticos. As linhagens testadas frente à resistência aos antibióticos foram: a TA98 (ampicilina), YG1041 (ampicilina e canamicina), YG5161 (ampicilina) e todas passaram nesta etapa de confirmação dos plasmídeos. A linhagem YG7108 também foi testada quanto sua resistência aos antibióticos canamicina e cloranfenicol. Somente a colônia 1 não apresentou resistência ao antibiótico cloranfenicol e foi descartada. A figura 12 exemplifica a resistência desta linhagem ao antibiótico canamicina, onde os traços pontilhados indicam o local onde foi aplicado o antibiótico e o crescimento sobre as áreas pontilhadas comprova a resistência de todas as colônias testadas.

Figura 12 - Placa de ágar mínimo suplementado com biotina, histidina e uma faixa do antibiótico canamicina para o teste de resistência ao antibiótico

As colônias que não passaram em algum dos testes foram consideradas não aceitáveis para uso e, conseqüentemente, descartadas. Dentre todas as colônias aprovadas foi selecionada uma de cada linhagem que apresentou os melhores resultados em todos os testes. O número das colônias selecionadas inicialmente para o ensaio *Salmonella*/microsossoma em microssuspensão foi: nº 5 para a TA98, nº 4 - YG1041, nº 4 - TA1538, nº 1 - YG5161, nº 3 - TA1535 e nº 2 - YG7108.

5.4.2 Potência mutagênica das amostras de material particulado de ar para as linhagens de *S. typhimurium*

Os resultados brutos dos ensaios de doses respostas, as médias dos números de revertentes, o desvio padrão para cada dose, as razões de mutagenicidade e as potências mutagênicas de todas as amostras para as linhagens TA98 (Tabela A1), YG1041 (Tabela A2), TA1538 (Tabela A3), YG5161 (Tabela A4), TA1535 (Tabela A5) e YG7108 (Tabela A6) estão no apêndice. Os resultados dos ensaios com o branco da extração foram satisfatórios para todas as linhagens apresentando ausência de mutagenicidade (Tabela A7 – apêndice).

5.4.2.1 Linhagens TA98 e YG1041 de *S. typhimurium*

As tabelas a seguir apresentam as potências mutagênicas expressas por massa de extrato orgânico (revertentes/ μg de MOE) e por volume de ar (revertentes/ m^3) procedentes das amostras do estudo frente às linhagens TA98 (Tabela 13) e YG1041 (Tabela 14).

Tabela 13 - Potência mutagênica expressa por massa de extrato orgânico (revertentes/ μg de MOE) e por volume de ar (revertentes/ m^3) para as amostras procedentes do estudo frente à linhagem TA98 na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica

Amostras	Potência Mutagênica (revertentes/ μg de MOE ^a)		Potência Mutagênica (revertentes/ m^3)	
	-S9	+S9	-S9	+S9
01	11,3	1,5	377	50
02	26,6	3,4	532	68
03	31,4	3,8	285	34
04	34,8	3,3	268	25
05	15,5	3,5	141	32
06	17,7	1,7	84	8

Notas: a - Material Orgânico Extraído

Todos os extratos analisados foram capazes de induzir uma resposta mutagênica nas linhagens TA98 e YG1041 de *S. typhimurium*, na ausência e na presença de ativação metabólica (S9). Esses resultados indicam a presença de mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura e que necessitam, ou não, de ativação metabólica exógena, nas amostras do estudo.

Os índices mais elevados para a linhagem TA98 durante o período de amostragem foram obtidos na ausência de ativação metabólica, sendo estes pertencentes às amostras n° 04 (34,8 revertentes/ μg de MOE) e n° 02 (532 revertentes/ m^3). Em relação à análise da quantidade testada por placa (Tabela A1 – apêndice), todas as amostras apresentaram uma relação curva dose resposta linear com valores de $p \leq 0,05$ indicando inclinação positiva na origem da curva calculada.

Para a linhagem YG1041, os índices mais elevados observados também foram na ausência de S9, para a amostra n° 04 tanto no cálculo expresso por massa de extrato orgânico quanto por volume de ar. Para a análise em função da quantidade testada por placa (Tabela A2 – apêndice), esta linhagem apresenta algumas amostras com relação curva dose-resposta linear (n° 01 e 02 $\pm$ S9; n° 05 e 06 +S9), indicando positividade na inclinação da curva. As amostras n° 03 e 04 apresentaram toxicidade a partir das doses de 10 μg de MOE/placa (sem S9) e de 50 μg de MOE/placa (com S9). As amostras n° 05 e 06 apresentaram toxicidade apenas na ausência de S9 a partir das doses de 25 e 50 μg de MOE/placa,

respectivamente. Estas amostras apresentam positividade na inclinação da curva e a partir das doses tóxicas ocorreu letalidade para as células por excesso de dano no DNA, ou ainda, pela ação de outros compostos tóxicos presentes nestas amostras.

Tabela 14 - Potência mutagênica expressa por massa de extrato orgânico (revertentes/ μg de MOE) e por volume de ar (revertentes/ m^3) para as amostras procedentes do estudo frente à linhagem YG1041 na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica

Amostras	Potência Mutagênica (revertentes/ μg de MOE ^a)		Potência Mutagênica (revertentes/ m^3)	
	-S9	+S9	-S9	+S9
01	137	36	4580	1200
02	68	26	1358	524
03	920	208	8357	1890
04	1270	266	9737	2043
05	920	326	8356	2964
06	280	120	1342	572

Notas: a - Material Orgânico Extraído

A figura 13 apresenta os valores observados das potências mutagênicas comparando as linhagens TA98 e YG1041 na ausência (Figura 13A) e na presença (Figura 13B) de S9. Os valores foram expressos em revertentes por μg de MOE.

Figura 13 - Comparação da potência mutagênica (rev./µg de MOE) das amostras do estudo entre as linhagens TA98 e YG1041 na ausência (A) e presença (B) de ativação metabólica (S9). A potência foi apresentada em escala logarítmica

Quando realizamos uma comparação entre a potência mutagênica das duas linhagens (TA98 e YG1041), tanto na ausência quanto na presença de ativação metabólica é possível observar um aumento na mutagenicidade das amostras para a linhagem YG1041 em relação a sua parental TA98. A razão apresentada entre as linhagens (YG1041/TA98) para este aumento da mutagenicidade foi de 2,6 a 59,3 na ausência, e de 7,7 a 93,2 na presença de S9. Esta resposta aumentada da YG1041 e o decréscimo da resposta com S9 são indicativos de que os compostos que estão causando a mutagenicidade observada são pertencentes ao grupo dos nitroaromáticos (UMBUIZEIRO et al., 2008a, 2008b; CLAXTON; MATTHEWS; WARREN, 2004). Os nitrocompostos são aqueles compostos que apresentam pelo menos um grupamento nitro (NO_2) ligado a um radical orgânico, que pode ser um HPA (nitroaromático). Podem ser formados durante a combustão de compostos orgânicos (KOJIMA et al., 2010) ou por reações atmosféricas através de processos químicos ou fotoquímicos (com a utilização da luz solar) a partir óxidos de nitrogênio (NO_x) existentes na atmosfera. Suas principais fontes são por processos de combustão em veículos automotores, processos industriais, usinas térmicas, incineração e também pela oxidação de fertilizantes a base de nitrogênio (MANAHAM, 2005).

Ball et al., (1984) demonstraram que os nitrocompostos podem ser metabolizados a diversos subprodutos em virtude da ação das enzimas do citocromo P450 transformando-os em compostos com menor, igual ou maior potencial mutagênico. No caso do 1-nitropireno, os subprodutos detectados em maior quantidade em um extrato orgânico após incubação com S9 foram: 3-, 6- e 8-Hidroxi-1-nitropireno, N-acetil-1-aminopireno e 1-aminopireno, sendo os N-Hidroxi-1-nitropireno encontrados em maior proporção e que possuem mutagenicidade reduzida com a adição de S9, exceto o 6-Hidroxi-1-nitropireno que é completamente dependente de S9.

Os nitrocompostos podem ainda ter sua mutagenicidade reduzida com a adição de S9 por meio de um seqüestro do substrato ou adsorção à proteína não específica, que pode ocorrer em menor proporção, mas que foram evidenciadas na comparação entre a ausência e presença dos cofatores da mistura S9 que promovem as reações de redução e oxidação da ativação metabólica exógena (KOHAN; CLAXTON, 1983).

5.4.2.2 Linhagens TA1538 e YG5161 de *S. typhimurium*

As tabelas mostradas a seguir apresentam as potências mutagênicas expressas por massa de extrato orgânico (revertentes/ μg de MOE) e por volume de ar (revertentes/ m^3) procedentes das amostras do estudo frente às linhagens TA1538 (Tabela 15) e YG5161 (Tabela 16).

Quando analisamos a potência mutagênica das linhagens TA1538 e YG5161 de *S. typhimurium* novamente observamos que todos os extratos orgânicos analisados foram capazes de induzir uma resposta mutagênica, na ausência e na presença de ativação metabólica (S9). Esses resultados corroboram com a presença de mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura, que necessitam, ou não, de metabolização exógena, em todas as amostras estudadas.

Tabela 15 - Potência mutagênica expressa por massa de extrato orgânico (revertentes/ μg de MOE) e por volume de ar (revertentes/ m^3) para as amostras procedentes do estudo frente à linhagem TA1538 na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica

Amostras	Potência Mutagênica (revertentes/ μg de MOE ^a)		Potência Mutagênica (revertentes/ m^3)	
	-S9	+S9	-S9	+S9
01	18,3	6,3	610	210
02	27,2	11,2	544	224
03	47,2	11,7	429	106
04	48,2	11,5	371	88
05	28,5	8,2	259	74
06	23,0	5,4	110	26

Notas: a - Material Orgânico Extraído

As maiores potências mutagênicas observadas para a linhagem TA1538 foram à ausência de S9, para a amostra nº 04 (48,2 revertentes/ μg de MOE) e nº 01 (610 revertentes/ m^3). Na análise com adição de S9, o resultado foi similar às linhagens apresentadas anteriormente onde houve redução na mutagenicidade apresentada em relação à ausência de ativação metabólica.

Tabela 16 - Potência mutagênica expressa por massa de extrato orgânico (revertentes/ μg de MOE) e por volume de ar (revertentes/ m^3) para as amostras procedentes do estudo frente à linhagem YG5161 na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica

Amostras	Potência Mutagênica (revertentes/ μg de MOE ^a)		Potência Mutagênica (revertentes/ m^3)	
	-S9	+S9	-S9	+S9
01	5,3	2,1	177	70
02	9,3	6,3	186	126
03	12,5	6,5	114	59
04	17,8	3,9	137	30
05	11,0	3,5	100	32
06	9,5	2,5	45	12

Notas: a - Material Orgânico Extraído

Para a linhagem YG5161 sem S9, encontramos a amostra nº 04 novamente com o maior índice de potência mutagênica frente à massa de material extraído e a amostra nº 01 quando analisada frente ao volume de ar.

Para a análise em função da quantidade testada por placa (Tabelas A3 e A4 – apêndice), todas as amostras apresentaram uma relação dose-resposta positiva e inclinação da curva linear para ambas as linhagens TA1538 e YG5161.

Quando comparadas as potências mutagênicas entre as duas linhagens, como pode ser observado na figura 14, encontramos elevados índices para a linhagem TA1538 tanto na presença quanto na ausência de S9. A razão entre estas linhagens para este aumento na mutagenicidade observado variou de 2,4 a 3,8 na ausência e de 1,8 a 3,0 na presença de ativação metabólica.

Devido a linhagem YG5161 ser considerada mais sensível na detecção de compostos do tipo HPA não substituídos em relação à linhagem parental TA1538, os resultados indicam que estes não são os compostos responsáveis pela mutagenicidade observada. Outro fato que corrobora com estes achados se dá em virtude da mutagenicidade ter sido reduzida na presença de S9, uma vez que estes compostos necessitam de ativação metabólica para se tornarem ativos. Isso não significa que estes compostos estejam ausentes nas amostras estudadas, mas que podem estar presentes em concentrações relativamente baixas, o que não seria detectado através do ensaio *Salmonella*/microsoma com a quantidade máxima de 50 µg/MOE por placa. Esta situação seria possível, por exemplo, para o BaP, o qual a linhagem YG5161 consegue detectá-lo apenas em concentrações superiores a 1 µg do composto.

Figura 14 - Comparação da potência mutagênica (rev./ μ g de MOE) das amostras do estudo entre as linhagens TA1538 e YG5161 na ausência (A) e presença (B) de ativação metabólica (S9). A potência foi apresentada em escala logarítmica

5.4.2.3 Linhagens TA1535 e YG7108 de *S. typhimurium*

Ao analisar a potência mutagênica das linhagens TA1535 e YG7108 de *S. typhimurium* observamos que todos os extratos orgânicos analisados não foram capazes de induzir uma resposta mutagênica (Tabelas A5 e A6 – apêndice), tanto na ausência quanto na presença de ativação metabólica (S9), indicando que agentes alquilantes, se presentes não estão em concentrações suficientes para serem detectados nas condições do ensaio.

5.4.3 Efeito do sistema de metabolização (mistura S9) na mutagenicidade do material particulado de ar

O decréscimo da mutagenicidade com S9 é evidente em todas as amostras do estudo (Figura 15). Esta resposta e a mutagenicidade aumentada com a linhagem YG1041 em relação a TA98 são indicativos de que os compostos responsáveis pela maioria da mutagenicidade detectada são os nitroaromáticos (UMBUZEIRO et al., 2008a, 2008b; CLAXTON; MATTHEWS; WARREN, 2004). A redução na mutagenicidade com S9 observado para a linhagem TA98 foi de 4,4 a 15,8 vezes; para a linhagem YG1041 foi de 2,3 a 4,8 vezes; para a TA1538 foi de 2,4 a 4,3 vezes e para a YG5161 foi de 1,5 a 4,6 vezes.

O perfil de resposta observado indica três possíveis situações:

- 1) A presença de mutágenos que não necessitam de ativação metabólica exógena e que são parcialmente inativados com a mistura S9 tornando-se menos ativos;
- 2) A presença de mutágenos de diferentes tipos, onde um tipo não é alterado pela presença do S9, apresentando a mesma potência mutagênica e outro tipo que é inativado pelo sistema de metabolização exógena, tornando-se não mutagênico;
- 3) Ou ainda, a presença de mutágenos de diferentes tipos, mas neste caso alguns mutágenos que não necessitam de ativação metabólica exógena são totalmente inativados, tornando-se não mutagênicos e outros mutágenos se tornam ativos após a adição da mistura S9.

Figura 15 - Potências mutagênicas (revertentes por μg de MOE) das linhagens TA98 (A), YG1041(B), TA1538 (C) e YG5161 (D) comparando as condições de ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica. As potências foram apresentadas em escala logarítmica

5.4.4 Validação das combinações seletivas de linhagens *S. typhimurium*

5.4.4.1 Par YG1041/TA98

A sensibilidade e especificidade da linhagem YG1041 para os nitrocompostos em relação à sua parental TA98 já havia sido testada por Hagiwara et al. (1993) e foi confirmada com o 1-NP por Franco et al. (2011), conforme podemos observar na figura 16 (A e B). Desta forma, resolvemos testar este mesmo composto com as linhagens TA1538 e YG5161 que também apresentaram resultados positivos para

as amostras do estudo (Figura 16 C e D). É possível perceber que 1-NP apresentou mutagenicidade com as quatro linhagens, porém a maior sensibilidade da linhagem YG1041 foi evidenciada com relação às linhagens restantes, tanto na ausência quanto na presença de S9. Isto ocorre devido ao plasmídeo pYG233, presente nesta linhagem, possuir superexpressão das enzimas NR e O-AT, que catalisam a bioativação da maioria dos nitrocompostos para arilhidroxilaminas e, conseqüentemente são então esterificadas (Ester de ácido Hidroxâmico), as quais podem formar adutos com o DNA celular (ROSENKRANZ; MERMELSTEIN, 1983). Em seguida, temos a mutagenicidade das linhagens TA98, TA1538 e YG5161 que possuem os níveis normais destas enzimas em uma célula bacteriana. É necessário ressaltar que o 1-NP apresentou mutagenicidade reduzida para todas as linhagens na presença de S9, demonstrando mais uma vez, a resposta da ativação metabólica sobre este tipo de composto.

(A)

(B)

(C)

(D)

Figura 16 – Curvas dose resposta do 1-nitropireno com as linhagens TA98/YG1041 (A e B) e TA1538/YG5161 (C e D) na ausência e presença de S9. Fonte de A e B: FRANCO et al., (2011)

5.4.4.2 Par YG5161/TA1538

Devido a elevada sensibilidade reconhecida da linhagem YG5161 na detecção de compostos do tipo HPA não substituído foi realizado um ensaio com o seu principal representante, o BaP na presença de S9. É possível observarmos na figura 17 que o BaP apresentou mutagenicidade com todas as linhagens testadas (TA98, YG1041, TA1538 e YG5161), porém a linhagem YG5161 apresentou maior

sensibilidade na detecção deste composto, devido ao plasmídeo pYG568 que superproduz DNA-Polimerase IV, seguida das linhagens YG1041, que possui superexpressão das enzimas NR e O-AT, TA98, que possui o plasmídeo pKM101, carregando gene *mucAB* aumentando o estímulo ao sistema *error-prone* e por último, a TA1538, que possui apenas as características básicas das linhagens.

Figura 17 – Curvas dose resposta do benzo[a]pireno com as linhagens TA98, YG1041, TA1538 e YG5161 na presença de S9

De acordo com Matsui et al. (2006) a DNA polimerase IV é reportada para contornar adutos de guanina- N^2 de benzo[a]pireno diol epóxido (molécula de BaP transformada após ativação metabólica) *in vitro* com alta eficiência e alta fidelidade comparada a DNA polimerase II e DNA polimerase V. Desta forma, a DNA polimerase IV incorpora corretamente citosina no lugar da guanina com aduto na sequência GGG do gene *hisG*, portanto não levando a substituição dos pares de bases. A correta inserção da citosina na sequência CGCGCGCG do gene *hisD*, no entanto, pode induzir o deslize de dois pares de bases levando a deleção (deslocamento do quadro de leitura) dos mesmos.

5.4.4.3 Par YG7108/TA1535

O EMS foi utilizado para testar a sensibilidade da linhagem YG7108 em relação a sua parental TA1535, é pertencente ao grupo de agentes alquilantes e demonstrou ser um potente mutágeno para a linhagem YG7108 (YAMADA et al., 1997). A figura 18 apresenta os resultados observados com o par de linhagens que detecta mutações do tipo substituição de pares de bases na ausência e na presença de S9. A sensibilidade da linhagem YG7108 na ausência de S9 foi evidente para este mutágeno, uma vez que a linhagem TA1535 apresentou resultados negativos. De acordo com Yamada et al., (1997) esta sensibilidade ocorre em virtude das deleções dos genes *ada_{ST}* e *ogt_{ST}* que codificam metiltransferases responsáveis pelo reparo (alquiltransferência) das lesões causadas por este grupo de compostos (agentes alquilantes).

Figura 18 – Curvas dose resposta do etilmetano sulfonato com as linhagens TA1535 e YG7108 na ausência e presença de S9

5.4.5 Comparação da mutagenicidade observada com dados da literatura

5.4.5.1 Trabalhos de material particulado de ar

Em virtude da utilização de várias linhagens de *S. typhimurium* e entre elas, algumas construídas recentemente, encontramos certa dificuldade para comparar a mutagenicidade observada no presente estudo com outros trabalhos da literatura. Desta forma, foram selecionados os estudos de material particulado de ar que aplicaram o mesmo protocolo, o ensaio *Salmonella*/microsossoma em microssuspensão e as potências mutagênicas (revertentes por m^3) observadas com a linhagem TA98 foram comparadas na ausência e presença de S9 (Figura 19).

Figura 19 - Comparação entre as potências mutagênicas observadas entre as amostras do estudo e os dados publicados na literatura. Fontes: KADO et al., 1986; CLAXTON et al., 2001; MONARCA et al., 1997; CERNÁ et al., 1999; DUCATTI; VARGAS, 2003; VARGAS, 2003; CORONAS et al., 2008, 2009; UMBUZEIRO et al., 2008a; SATO, 1995; DE MARTINIS et al., 1999

Comparando as mutagenicidades observadas para amostras coletadas no estado de São Paulo, incluindo a Região Metropolitana, interior e Cubatão (SATO, 1995; DE MARTINIS et al., 1999; UMBUZEIRO et al., 2008a), encontramos valores muito semelhantes tanto na ausência quanto na presença de S9, exceto para a amostra nº 02, que apresentou mutagenicidade maior do que todos os dados da literatura publicados até o momento no Brasil. Não foi possível atribuir esta mutagenicidade aumentada a nenhum evento específico.

Analizando os trabalhos do estado do Rio Grande do Sul (DUCATTI; VARGAS, 2003; VARGAS, 2003; CORONAS et al., 2008, 2009), as potências observadas foram menores que as obtidas neste estudo. Embora, o padrão de redução da mutagenicidade após a adição de S9 se mantenha em todas as amostras coletadas em São Paulo e no Rio Grande do Sul.

Na comparação da mutagenicidade com outros países, os resultados observados na ausência de S9 foram similares aos apresentados em cidades da República Tcheca (CERNÁ et al., 1999) e dos Estados Unidos (KADO et al., 1986; CLAXTON et al., 2001), porém muito maiores do que os de Bréscia, na Itália (MONARCA et al., 1997). Também é possível observar que as amostras coletadas nos Estados Unidos apresentaram diferenças no padrão de mutagenicidade na presença de S9 em relação ao presente estudo, pois houve aumento na mutagenicidade indicando a presença de compostos que necessitam de ativação metabólica exógena para se tornarem mutagênicos. Isso reforça que no Brasil, há predominância de nitrocompostos na atmosfera.

O número de revertentes por m^3 se refere à mutagenicidade relacionada à exposição de um organismo. Embora alta atividade mutagênica tenha sido observada nas amostras de material particulado na cidade de Limeira em São Paulo, é difícil estabelecer quais seriam as possíveis consequências desta exposição à saúde humana. Sabemos que alguns fatores como: 1) as possíveis diferenças entre os organismos utilizados e os ensaios “*in vivo*” e “*in vitro*”; 2) a biodisponibilidade dos compostos mutagênicos que estão adsorvidos ao material particulado de ar; e 3) as possíveis interações, que podem ser sinérgicas ou antagônicas, entre os compostos desta mistura complexa, podem interferir e dificultar a extrapolação destes dados para uma avaliação de riscos em humanos. De qualquer forma, considerando que

um indivíduo respira em média $15\text{m}^3/\text{dia}$ (SATO, 1995) e que a menor potência mutagênica observada foi para a linhagem YG5161 ($45\text{ revertentes}/\text{m}^3$), todas as amostras do presente estudo seriam capazes de induzir uma resposta mutagênica nas linhagens TA98, YG1041, TA1538 e YG5161 com o ensaio *Salmonella*/microsossoma em microssuspensão em um período inferior a 1 hora de exposição ($0,625\text{m}^3/\text{hora} \rightarrow 0,01\text{m}^3/\text{min.}$), pois apenas $0,21\text{ m}^3$ de volume de ar aspirado em aproximadamente 20 minutos já produz uma resposta mutagênica na situação menos crítica de poluição para PTS.

Embora existam dificuldades na extrapolação dos dados, é possível afirmar que a mutação é um processo primário para o desenvolvimento de muitas doenças. No caso de câncer, a doença pode ser desenvolvida por meio de mudanças dinâmicas no genoma que irão gerar células malignas, porém há muitas outras doenças que ocorrem em decorrência de processos genéticos (CLAXTON; WOODALL, 2007). Esta preocupação tem dirigido muitos pesquisadores e estudos têm demonstrado que o material particulado, especialmente aqueles relacionados ao tráfego de veículos, contém um grande número de substâncias químicas mutagênicas/genotóxicas, que podem causar danos no DNA e promover neoplasmas malignos (VALAVANIDIS, FIOTAKIS, VLACHOGIANNI, 2008). Pope III et al., (2002) associando material particulado fino ($< 2,5\text{ }\mu\text{m}$) e dados de mortalidade estimaram que a elevação de cada $10\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$ na concentração destas partículas em longos períodos de exposição estava associada com aproximadamente 6% e 8% no risco aumentado de mortalidade por doenças cardiopulmonares e câncer de pulmão, respectivamente. As análises do presente estudo foram realizadas em PTS, as quais POPE III et al. (2002) não encontraram associações com os casos de mortalidade, porém é necessário relembramos que as partículas coletadas por meio do equipamento HI-VOL possuem o tamanho entre $0,1$ e $100\text{ }\mu\text{m}$, portanto em menor proporção, mas as partículas com tamanho $\leq 2,5\text{ }\mu\text{m}$ também foram incluídas. Os autores focaram a importância da granulometria e da elevação na concentração destas partículas no ar quando falamos em exposição, mas os dados apresentados na figura 19 nos chamam a atenção para o importante papel dos mecanismos genotóxicos existentes em amostras de material particulado de ar, mesmo quando os níveis de qualidade do ar não são ultrapassados.

5.4.5.2 Trabalhos com compostos puros

Na tentativa de encontrar possíveis compostos mutagênicos majoritários presentes nas amostras do estudo que pudessem representar a mutagenicidade observada com a mistura, trabalhos providos da literatura foram selecionados para a criação de perfis de mutagenicidade para alguns compostos químicos puros já testados (Figuras 20, 21, 22, 23 e 24). A figura 20 apresenta a razão entre o número de revertentes por μg do referido composto para as linhagens YG1041/TA98 em comparação com os dados do estudo na ausência de S9.

Figura 20 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as amostras do estudo para o par de linhagens YG1041/TA98 na ausência de S9. Os dados foram apresentados em escala logarítmica. Fonte: HAGIWARA et al., 1993; KUMMROW et al., 2005

Analisando os trabalhos que compararam a sensibilidade entre o par de linhagens YG1041/TA98 (HAGIWARA et al., 1993; KUMMROW et al., 2005) é possível inferir que qualquer um destes nitrocompostos, como 2-nitrofluoreno, 2,6-dinitrotolueno, 1-NP, 1,8-dinitropireno e 3-nitrobenzantrona pode ser candidato que represente a mistura complexa das amostras de material particulado de ar, pois apresentam o mesmo perfil de resposta, ou seja, aumento de mutagenicidade com a

YG1041 em relação a TA98. O composto *N*-Hidroxi-2-acetilaminofluoreno é uma amina aromática metabolizada, portanto, para ser mutagênica necessita de ativação metabólica exógena promovida pela ação das enzimas microsossomais do fígado de rato, no ensaio *Salmonella*/microsossoma, a partir da molécula do 2-acetilaminofluoreno. Não é possível afirmar se este composto pode estar presente nas amostras de material particulado de ar, uma vez que não sabemos se também pode ser um produto de reações atmosféricas. De qualquer forma, as aminas aromáticas pertencem a uma classe de compostos que possui um hidrocarboneto aromático, como o fluoreno, por exemplo, ligado diretamente a um grupamento amino. As aminas aromáticas têm sido empregadas como produtos industriais e por isso, a atenção tem sido voltada em relação à exposição ocupacional. Algumas destas aminas aromáticas demonstraram causar câncer de bexiga, ureter e de pélvis em humanos, e ainda são suspeitos carcinógenos de próstata, fígado e pulmão (MANAHAN, 2005).

Já na figura 21, onde compostos foram testados na presença de ativação metabólica, é possível perceber que *m*-Fenilenediamino e o 7,12-Dimetilbenz[a]antraceno não são candidatos a representantes da mistura, uma vez que não apresentam o mesmo perfil das amostras do estudo. Já compostos como o 2-acetilaminofluoreno, 2-aminofluoreno e 3-nitrobenzantrona possuem o mesmo perfil de respostas para o par YG1041/TA98, podendo ser considerados como candidatos. Os nitrocompostos não foram testados nesta etapa, por serem sabidamente menos mutagênicos na presença de S9.

Figura 21 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as amostras do estudo para o par de linhagens YG1041/TA98 na presença de S9. Os dados foram apresentados em escala logarítmica. Fonte: HAGIWARA et al., 1993; KUMMROW et al., 2005

Em relação ao outro par de linhagens (YG5161/TA1538) que apresentou resultados positivos é possível verificar que todas as amostras demonstraram resultados maiores com a linhagem parental TA1538 do que com a derivada YG5161. Um pequeno aumento da TA1538 em relação sua derivada YG5161 foi observado por Matsui et al., (2006) apenas para o composto *N*-hidroxi-acetilaminofluoreno na ausência de S9 (figura 22). Nenhum composto apresentou o mesmo padrão observado para as amostras do estudo na presença de S9, embora o 2-acetilaminofluoreno tenha apresentado mutagenicidade igual entre as duas linhagens (figura 23). Em comparação ao presente estudo, o *N*-hidroxi-acetilaminofluoreno foi o único, dentre os compostos testados por Matsui et al., (2006), que coincidiu com o perfil apresentado para o par YG5161/TA1538. Analisando os outros compostos testados é possível perceber que o BaP, alguns de seus derivados (benzo[a]pireno-7,8-diidroepóxido, benzo[a]pireno diol epóxido, 3-nitro-benzo[a]pireno, benzo[a]pireno-4,5-diidroepóxido, 6-nitro-benzo[a]pireno, 1-nitro-6-benzo[a]pireno, 3-nitro-6-benzo[a]pireno e 10-azabeno[a]pireno), derivados de antraceno (1 e 2-aminoantraceno, 7,12-dimetilbenzo[a]antraceno e benzo[a]antraceno), *N*-Etil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina, 4-nitroquinolina-óxido, 3-

metilcolantreno e 6-aminocriseno não são candidatos a representantes da mistura na ausência e a presença de S9, visto que o perfil apresentado para este par de linhagens é diferente das amostras do estudo.

Figura 22 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as amostras do estudo para o par de linhagens YG5161/TA1538 na ausência de S9. Os dados foram apresentados em escala logarítmica. Fonte: MATSUI et al., 2006

Figura 23 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as amostras do estudo para o par de linhagens YG5161/TA1538 na presença de S9. Os dados foram apresentados em escala logarítmica. Fonte: MATSUI et al., 2006

Sabemos que a TA98 é uma linhagem derivada da TA1538 com a adição do plasmídeo pKM101, o que a torna mais sensível em relação a sua parental TA1538, porém em virtude das amostras apresentarem resultados maiores com a linhagem parental (comparação não feita anteriormente), resolvemos comparar os resultados observados com dados da literatura para estas duas linhagens. Apenas um trabalho foi encontrado (ROSENKRANZ; MERMELSTEIN, 1983) realizando este tipo de comparação na ausência de ativação metabólica e de acordo com a figura 24, compostos como 1 e 2-nitronaftaleno, 5-nitroacenaftaleno, 2-nitrofluoreno, 2-nitroantraceno, 3-nitrofluoranteno, 8-nitrofluoranteno, 1-NP, 1,3-dinitropireno, 1,6-dinitropireno, 1,8-dinitropireno, 1,3,6-trinitropireno, 1,3,6,8-tetranitropireno, 1-nitrobenzo[e]pireno, 1-nitro-9-(3'dimetilamino-propilamino)acridina diidroclorido e 2-nitro-9-(3'dimetilamino-propilamino)acridina diidroclorido não são candidatos representantes do perfil observado com as amostras do estudo. Em relação ao mesmo perfil, podemos inferir que a 2,7-dinitrofluoreno, 2,7-dinitro-9-fluorenona, 2,4,7-trinitro-9-fluorenona, 2,4,5,7-tetranitro-9-fluorenona e 2-nitrofenantreno podem ser candidatos representantes destas amostras. Não há dados de mutagenicidade para estas linhagens na presença de S9.

Figura 24 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as amostras do estudo para o par de linhagens TA98/TA1538 na ausência de S9. Os dados foram apresentados em escala logarítmica. Fonte: ROSENKRANZ; MERMELSTEIN, 1983

Alguns compostos foram encontrados como possíveis candidatos a serem representantes da mistura complexa para os pares YG1041/TA98, YG5161/TA1538 e TA98/TA1538, sendo eles os nitrocompostos (como 2,7-dinitrofluoreno, 2,6-dinitrotolueno, 2,7-dinitro-9-fluorenona, 2,4,7-trinitro-9-fluorenona, 2,4,5,7-tetranitro-9-fluorenona e 2-nitrofenantreno) e aminas aromáticas (como o 2-acetilaminofluoreno, 2-aminofluoreno e *N*-Hidroxi-acetilaminofluoreno). Os compostos 2-nitrofluoreno, 1-NP e 1,8-dinitropireno foram incluídos quando a mutagenicidade do par YG1041/TA98 foi comparada, porém quando observado o perfil para o par TA98/TA1538, estes compostos foram excluídos por não apresentarem o mesmo perfil das amostras, indicando que não devem estar presentes em quantidades suficientes para representar a mistura. Os ensaios do presente estudo foram realizados com quantidade máxima de 50 µg/MOE por placa da mistura complexa e as linhagens de *S. typhimurium* apresentam atividades mutagênicas diferentes para a detecção, que ocorre em função dos mutágenos e suas quantidades presentes nas amostras. Desta forma, seria necessária uma grande quantidade de amostra por placa para que alguns compostos possam estar presentes em níveis detectáveis para a *S. typhimurium*.

Com base nesses achados, foram analisadas as potências mutagênicas de cada substância química (em revertentes por ng) que, até o momento, foram consideradas como possíveis candidatas a representante da mistura (Tabela 17), e foi possível observar que seria necessário que a amostra apresentasse 3,05 ng de 2,7-dinitrofluoreno, 377 ng de 2,6-dinitrotolueno, 1,6 ng de 2,7-dinitro-9-fluorenona, 1,4 ng de 2,4,7-trinitro-9-fluorenona, 5,65 ng de 2,4,5,7-tetranitro-9-fluorenona, 11,3 ng de 2-nitrofenantreno, 21,4 ng de 2-acetilaminofluoreno ou 3,8 ng de 2-aminofluoreno em 1 µg de MOE para ser capaz de induzir a menor resposta mutagênica observada nas amostras do estudo com a linhagem TA98 (11,3 e 1,5 revertentes/µg de MOE na ausência e presença de S9, respectivamente), o que os excluem de serem principais representantes da mistura, já que estas são concentrações extremamente altas quando falamos em amostras atmosféricas. O composto *N*-Hidroxi-2-acetilaminofluoreno deveria ser o único composto presente, já que seria necessário 1,1 µg em 1 µg de MOE para haver esta indução, o que é impossível. Para a linhagem TA1538 o padrão se repete, onde o composto que deveria estar presente em menor quantidade seria o 2,4,7-trinitro-9-fluorenona na

concentração mínima de 1,1 ng. Em relação a YG1041 é possível observarmos a menor resposta mutagênica com quantidade de 0,8 ng de 2-aminofluoreno, porém ainda é uma alta concentração. Desta forma, torna-se difícil escolher um destes compostos para representar a mistura, em virtude da necessidade de grandes quantidades para induzir a menor resposta mutagênica observada nas amostras.

Tabela 17 - Potência mutagênica (revertentes/ng) observada para os compostos puros considerados candidatos a representantes da mistura complexa

Compostos	Revertentes induzidas (<i>his</i> ⁺) por ng			Grupos de compostos
	TA1538	TA98	YG1041	
Grupo 1				
2,7-Dinitrofluoreno	6	3	-	Nitrocompostos
2,6-Dinitrotolueno	-	0,03	39	
2,7-Dinitro-9-fluorenona	14	7	-	
2,4,7-Trinitro-9-fluorenona	17	8	-	
2,4,5,7-Tetranitro-9-fluorenona	6	2	-	
2-Nitrofenantreno	0,6	1	-	
Grupo 2				
2-Acetilaminofluoreno	-	0,07	17	Aminas aromáticas
2-Aminofluoreno	-	0,4	32	
N-Hidroxi-2-acetilaminofluoreno	-	0,01	1	

Fonte: HAGIWARA et al., 1993; ROSENKRANZ; MERMELSTEIN, 1983

Notas: -: Dados não disponíveis

Para uma análise final, as figuras 25 e 26 apresentam a potência mutagênica de todos os compostos juntos em comparação com uma das amostras do estudo (amostra 01-AR), na ausência e presença de S9, respectivamente. Não é possível inferir um destes candidatos apresentados como um representante da mutagenicidade observada com a mistura complexa, uma vez que não há dados de mutagenicidade de todos estes compostos puros com todas as linhagens utilizadas no estudo. Outra dificuldade é que geralmente os compostos são testados somente na ausência ou na presença de S9, de acordo com as características particulares de cada substância química, sendo eles mutágenos que necessitam, ou não, de ativação metabólica exógena. Assim, mais estudos de mutagenicidade com compostos puros utilizando os pares de linhagens propostos (TA98/YG1041 e

TA1538/YG5161) com análises químicas de extratos fracionados são necessários para verificar se esta abordagem pode ser útil em estudos de ADEB, e consequentemente na descoberta de novos poluentes atmosféricos.

Figura 25 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com uma amostra do estudo (AMOSTRA 01-AR) para os pares de linhagens TA98/TA1538, YG1041/TA98 e YG5161/TA1538 na ausência de S9. Os dados foram apresentados em escala logarítmica. ENNG: *N*-etil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina. Fonte: ROSENKRANZ; MERMELSTEIN, 1983; HAGIWARA et al., 1993; MATSUI et al., 2006; KUMMROW et al., 2005

Figura 26 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com uma amostra do estudo (AMOSTRA 01-AR) para os pares de linhagens TA98/TA1538, YG1041/TA98 e YG5161/TA1538 na presença de S9. Os dados foram apresentados em escala logarítmica. Fonte: HAGIWARA et al., 1993; MATSUI et al., 2006; KUMMROW et al., 2005

5.5 Ensaio Interlaboratorial

O laboratório do Centro Universitário SENAC, onde a parte prática deste trabalho foi realizada participou do “2º Programa de Comparação Interlaboratorial para o Teste de Mutação Reversa com *Salmonella typhimurium* – Teste de Ames – Ensaio *Salmonella*/microsoma”. Os resultados estiveram dentro dos padrões de aceitação para a utilização do ensaio *Salmonella*/microsoma, demonstrando competência para realização do ensaio em amostras reais (SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE E TERATOGENICO AMBIENTAL, 2009).

6 *Conclusões*

- As combinações seletivas de linhagens *S. typhimurium* (YG1041/TA98 e YG5161/TA1538) mostraram-se eficientes na caracterização da mutagenicidade de amostras de ar coletadas na cidade de Limeira (São Paulo), podendo ser utilizadas como uma importante ferramenta de auxílio do ensaio *Salmonella*/microsoma em microssuspensão em estudos de ADEB.
- De acordo com a resposta observada para o par YG1041/TA98 é possível inferir que os nitrocompostos e/ou aminas aromáticas são os principais responsáveis pela mutagenicidade detectada nas amostras estudadas. O perfil de resposta observado para o par YG5161/TA1538 indicou que os HPA não substituídos, como o BaP não são os principais responsáveis pelo efeito e, mais estudos serão necessários para relacionar o tipo de resposta obtida com os compostos responsáveis pelo efeito observado. As respostas com o par YG7108/TA1535 indicaram que os agentes alquilantes, se presentes não estão em concentrações suficientes para serem detectados nas condições do ensaio.
- A maioria das potências observadas para a TA98 na cidade de Limeira foi similar a outras regiões do estado de São Paulo, porém foi mais elevada do que as amostras do estado do Rio Grande do Sul e de outros locais do mundo. Com a adição de S9, observa-se que os valores obtidos para os Estados Unidos são mais elevados que os do Brasil, indicando diferenças nos compostos mutagênicos presentes nas áreas estudadas dos dois países.
- A comparação das respostas de mutagenicidade observadas entre as amostras de ar analisadas e o perfil de compostos puros encontrados na literatura não forneceram candidatos que pudessem representar a mistura. Mais estudos de mutagenicidade com compostos puros utilizando os pares de linhagens propostos (YG1041/TA98 e YG5161/TA1538) com análises químicas de extratos fracionados são necessários para verificar se esta abordagem pode ser útil em estudos de ADEB, e consequentemente na descoberta de novos poluentes atmosféricos.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ADONIS, M.; GIL, L. Mutagenicity of organic extracts from Santiago (Chile) airborne particulate matter. **Mutation Research**, v.292, n.1, p.51-61, 1993.

AGURELL, E.; STENSMAN, C. *Salmonella mutagenicity* of three complex mixtures assayed with the microsuspension technique: a WHO/IPCS/CSCM study. **Mutation Research**, v.276, n.1/2, p.87-91, 1992.

ALMEIDA, I. **A poluição atmosférica por material particulado na mineração a céu aberto**. São Paulo, 1999. 186p. Dissertação de Mestrado - Escola Politécnica – Universidade de São Paulo.

AMES, B.N.; LEE, F.D.; DURSTON, W.E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.70, n.3, p.782-786, 1973a.

AMES, B.N.; DURSTON, W.E.; YAMASAKI, E.; LEE, F.D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.70, n.8, p.2281-2285, 1973b.

ANDRADE, S.J. **Investigação sobre a composição química e avaliação da mutagenicidade do material particulado atmosférico sob a influência da queima da cana de açúcar**. São Paulo, 2004. 121p. Tese de Doutorado - Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ASSUNÇÃO, J.V. **Tecnologia de controle da poluição do ar para material particulado, gases, vapores e odores e verificação de sistemas**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública/Universidade de São Paulo, 2010. [Apostila].

ASSUNÇÃO, J.V.; MALHEIROS, T.F. Poluição atmosférica. In: PHILIPPI Jr., A.; PELICIONI, M.C.F., orgs. **Educação ambiental e sustentabilidade**. Barueri: Manole, 2005. p.135-174. (Coleção ambiental, 3).

AZUMA, S.; KISHINO, S.; KATAYAMA, S.; AKAHORI, Y.; MATSUSHITA, H. Highly sensitive mutation assay for mutagenicity monitoring of indoor air using *Salmonella typhimurium* YG1041 and a microsuspension method. **Mutagenesis**, v.12, n.5, p.373-377, 1997.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023

BAGLEY, S.T.; STOLTZ, S.L.; BECKER, D.M.; KEEN, R.E. Characterization of organic extracts from standard reference materials 1649, "urban dust/organics", and 1650, "diesel particulate matter", using a microsuspension assay: a WHO/IPCS/CSCM study. **Mutation Research**, v.276, n.1/2, p.81-86, 1992.

BALL, L.M.; KOAN, M.J.; CLAXTON, L.D.; LEWTAS, J. Mutagenicity of derivatives and metabolites of 1-nitropyrene: activations by rat liver S9 and bacterial enzymes. **Mutation Research**, v.138, n.23, p.113-125, 1984.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; McCANN, J.; PIKE, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. **Mutation Research**, v.97, n.4, p.267-281, 1982.

BOFFETTA, P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. **Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.608, n.2, p.157-162, 2006.

BRASIL. **Portaria Normativa n.348, de 14 de março de 1990**. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. Estabelece os padrões de qualidade do ar e as concentrações de poluentes atmosféricos. Disponível em: <http://www.inteligenciaambiental.com.br/sila/pdf/fportibama348-90.pdf>. Acesso em: 25 set. 2010.

BRASIL. **Resolução CONAMA n.003, de 28 de Junho de 1990**. Estabelece os padrões de qualidade do ar e as concentrações de poluentes atmosféricos. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res90/res0390>. Acesso em: 25 set. 2010.

CERNÁ, M.; PASTORKOVÁ, A.; VRBÍKOVÁ, V.; SMÍD, J.; RÖSSNER, P. Mutagenicity monitoring of airborne particulate matter (PM₁₀) in the Czech Republic. **Mutation Research**, v.444, n.2, p.373-386, 1999.

CLAXTON, L.D.; WARREN, S.; ZWEIDINGER, R.; CREASON, J. A comparative assessment of Boise, Idaho, ambient air fine particle samples using the plate and microsuspension *Salmonella mutagenicity* assays. **Science of the Total Environment**, v.275, n.1/3, p.95-108, 2001.

CLAXTON, L.D.; MATTHEWS, P.P.; WARREN, S.H. The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: *Salmonella mutagenicity*. **Mutation Research**, v.567, n.2/3, p.347-399, 2004.

CLAXTON, L.D.; WOODALL Jr., G.M. A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. **Mutation Research**, v.636, n.1/3, p.36-94, 2007.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Institucional. Meio Ambiente. Ar. Qualidade do ar. Informações básicas. **Padrões e Índices**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/ar/Informa??es-B?sicas/22- Padr?es-e-?ndices>. Acesso em: 01 mar. 2011.

CORONAS, M.V.; HORN, R.C.; DUCATTI, A.; ROCHA, J.V.; VARGAS, V.M. Mutagenic activity of airborne particulate matter in a petrochemical industrial area. **Mutation Research**, v.650, n.2, p.196-201, 2008.

CORONAS, M.V.; PEREIRA, T.S.; ROCHA, J.A.; LEMOS, A.T.; FACHEL, J.M.; SALVADORI, D.M.; VARGAS, V.M. Genetic biomonitoring of an urban population exposed to mutagenic airborne pollutants. **Environment International**, v.35, n.7, p.1023-1029, 2009.

DE MARTINIS, B.S.; KADO, N.Y.; CARVALHO, L.R.; OKAMOTO, R.A.; GUNDEL, L.A. Genotoxicity of fractionated organic material in airborne particles from São Paulo, Brazil. **Mutation Research**, v.446, n.1, p.83-94, 1999.

DEMARINI, D.M.; DALLAS, M.M.; LEWTAS, J. Cytotoxicity and effect on mutagenicity of buffers in a microsuspension assay. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v.9, n.5, p.287-295, 1989.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE TRÂNSITO. Estatística. Frota. **Dados da frota 2009**. Disponível em: <http://www.denatran.gov.br/frota.htm>. Acesso em: 28 set. 2010.

DOBIÁS, L.; KÚSOVÁ, J.; GAJDOS, O.; VIDOVÁ, P.; GAJDOSOVÁ, D.; HAVRÁNKOVÁ, J.; FRIED, M.; BINKOVÁ, B.; TOPINKA, J. Bioassay-directed chemical analysis and detection of mutagenicity in ambient air of the coke oven. **Mutation Research**, v.445, n.2, p.285-293, 1999.

DUCATTI, A.; VARGAS, V.M. Mutagenic activity of airborne particulate matter as an indicative measure of atmospheric pollution. **Mutation Research**, v.540, n.1, p.67-77, 2003.

ENERGÉTICA. **AGV PTS (Amostrador de grande volume para partículas totais em suspensão)**: manual de operação. Rio de Janeiro: ENERGÉTICA,

2009. 112p. [Dias, J.W.C., resp.]. Disponível em: http://www.energetica.ind.br/Manual_PTS.pdf. Acesso em: 10 ago. 2010.

FRANCO, A.; KUMMROW, F.; UMBUZEIRO, G.A.; VASCONCELLOS, C.; CARVALHO, L.R.F. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons derivatives and mutagenicity study in extracts of PM₁₀ collected in São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Toxicologia**, 2011. [No prelo].

GOOGLE MAPAS. Limeira. UNICAMP. **Faculdade de Tecnologia**. Disponível em: <http://maps.google.com.br/maps?hl=pt-br&tab=wl>. Acesso em: 25 out. 2010.

HAGIWARA, Y.; WATANABE, M.; ODA, Y.; SOFUNI, T.; NOHMI, T. Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. **Mutation Research**, v.291, n.3, p.171-180, 1993.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Cidades@. SP. Limeira. **Dados populacionais da cidade de Limeira**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acesso em: 28 set. 2010.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Previsões e estimativas das safras agrícolas do Estado de São Paulo**. Ano agrícola 2009/10. 4º Levantamento SP. Disponível em: http://ciagri.iea.sp.gov.br/bancoiea/subjetiva.aspx?cod_sis=1&idioma=1. Acesso em: 22 dez. 2010.

KADO, N.Y.; LANGLEY, D.; EISENSTADT, E. A simple modification of the Salmonella liquid-incubation assay – Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. **Mutation Research**, v.121, p.25-32, 1983.

KADO, N.Y.; GUIRGUIS, G.N.; FLESSEL, C.P.; CHAN, R.C.; CHANG, K.I.; WESOLOWSKI, J.J. Mutagenicity of fine (less than 2,5 microns) airborne particles: diurnal variation in community air determined by a Salmonella micro preincubation (microsuspension) procedure. **Environmental Mutagenesis**, v.8, n.1, p.53-66, 1986.

KOHAN, M.; CLAXTON, L. Mutagenicity of diesel-exhaust particle extract, 1-nitropyrene, and 2,7-dinitrofluorenone in *Salmonella typhimurium* under various metabolic activation conditions. **Mutation Research**, v.124, n.3/4, p.191-200, 1983.

KOJIMA, Y.; INAZU, K.; HISAMATSU, Y.; OKOCHI, H.; BABA, T.; NAGOYA, T. Influence of secondary formation on atmospheric occurrences of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particles. **Atmospheric Environment**, v.44, n.24, p.2873-2880, 2010.

KOKUBO, K.; YAMADA, M.; KANKE, Y.; NOHMI, T. Roles of replicative and specialized DNA polymerases in frameshift mutagenesis: mutability of *Salmonella typhimurium* strains lacking one or all of SOS-inducible DNA polymerases to 26 chemicals. **DNA Repair**, v.4, n.10, p.1160-1171, 2005.

KREWSKI, D.; LEROUX, B.G.; CREASON, J.; CLAXTON, L. Sources of variation in the mutagenic potency of complex chemical mixtures based on the Salmonella/microsome assay. **Mutation Research**, v.276, n.1/2, p.33-60, 1992.

KREWSKI, D.; BURNETT, R.; JERRETT, M.; POPE, C.A.; RAINHAM, D.; CALLE, E.; THURSTON, G.; THUN, M. Mortality and long-term exposure to ambient air pollution: ongoing analyses based on the American cancer society cohort. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v.68, n.13/14, p.1093-1109, 2005.

KUMMROW, F. **A técnica de *Blue rayon in situ* associada ao teste *Salmonella/microsoma* como estratégia para o monitoramento de água estuarinas quanto à presença de compostos policíclicos genotóxicos**. São Paulo, 2006. 1v. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

KUMMROW, F. ;RECH, C.M.; WARREN, S.H.; UMBUZEIRO, G.A. Avaliação da atividade mutagênica do 3-NBA (3-nitrobenzantrona) utilizando linhagens de *Salmonella typhimurium* com diferentes níveis das enzimas nitroreductase e acetiltransferase. **Genetic e Molecular Biology**, v. 28, n. 2, p. 141, 2005.

MANAHAN, S.E. **Environmental chemistry: particles in the atmosphere**. 8.ed. Boca Raton: CRC Press, 2005. 783p.

MARVIN, C.H.; HEWITT, L.M. Analytical methods in bioassay-directed investigations of mutagenicity of air particulate material. **Mutation Research**, v.636, n.1/3, p.4-35, 2007.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**, v.113, n.3/4, p.173-215, 1983.

MATSUI, K.; YAMADA, M.; IMAI, M.; YAMAMOTO, K.; NOHMI, T. Specificity of replicative and SOS-inducible DNA polymerases in frameshift mutagenesis: mutability of *Salmonella typhimurium* strains overexpressing SOS-inducible DNA polymerases to 30 chemical mutagens. **DNA Repair**, v.5, n.4, p.465-478, 2006.

MAY, W.E.; BENNER Jr., B.A.; WISE, S.A.; SCHUETZLE, D.; LEWTAS, J. Standards reference materials for chemical and biological studies of complex environmental samples. **Mutation Research**, v.276, n.1/2, p.11-22, 1992.

MONARCA, S.; CREBELL, R.; FERETTI, D.; ZANARDINI, A.; FUSELLI, S.; FILINI, L.; RESOLA, S.; BONARDELLI, P.G.; NARDI, G. Mutagens and carcinogens in size-classified air particulates of a Northern Italian town. **Science of the Total Environment**, v.205, n.2/3, p.137-144, 1997.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v.455, n.1/2, p.29-60, 2000.

PEREIRA, T.S.; GOTOR, G.N.; BELTRAMI, L.S.; NOLLA, C.G.; ROCHA, J.A.; BROTO, F.P.; COMELLAS, L.R.; VARGAS, V.M. *Salmonella* mutagenicity assessment of airborne particulate matter collected from urban areas of Rio Grande do Sul State, Brazil, differing in anthropogenic influences and polycyclic aromatic hydrocarbon levels. **Mutation Research**, v.702, n.1, p.78-85, 2010.

POPE III, C.A.; BURNETT, R.T.; THUN, M.J.; CALLE, E.E.; KREWSKI, D.; ITO, K.; THURSTON, G.D. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. **JAMA, the Journal of the American Medical Association**, v.287, n.9, p.1132-1141, 2002.

PREFEITURA MUNICIPAL DE LIMEIRA. Informações do Município. **Informações sobre o município**. Disponível em: <http://www.limeira.sp.gov.br/municipio/index.htm>. Acesso em: 28 set. 2010.

ROSENKRANZ, H.S.; MERMELSTEIN, R. Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes: all nitro-containing chemicals were not created equal. **Mutation Research**, v.114, p.217-267, 1983.

ROUBICEK, D.A.; UMBUZEIRO, G.A. Teste de mutagenicidade *Salmonella*/microsoma (teste de Ames) em microsuspenção. In: MOZETO, A.A.; UMBUZEIRO, G.A.; JARDIM, W.F., orgs. **Métodos de coleta, análises físico-químicas e ensaios biológicos e ecotoxicológicos de sedimentos de água doce**. São Carlos: Cubo Multimídia, 2006. p.173-177.

SATO, M.I.Z. **Caracterização da atividade mutagênica de poluentes atmosféricos da região metropolitana de São Paulo e área industrial de Cubatão através de ensaios microbianos**. São Paulo, 1995. 130p. Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo.

SATO, M.I.Z.; VALENT, G.U.; COIMBRÃO, C.A.; COELHO, M.C.; SANCHEZ SANCHEZ, P.; ALONSO, C.D.; MARTINS, M.T. Mutagenicity of airborne particulate organic material from urban and industrial areas of São Paulo, Brazil. **Mutation Research**, v.335, n.3, p.317-330, 1995.

SHARMA, A.K.; JENSEN, K.A.; RANK, J.; WHITE, P.A.; LUNDSTEDT, S.; GAGNE, R.; JACOBSEN, N.R.; KRISTIANSEN, J.; VOGEL, U.; WALLIN, H. Genotoxicity, inflammation and physico-chemical properties of fine particle samples from an incineration energy plant and urban air. **Mutation Research**, v.633, n.2, p.95-111, 2007.

SISTEMA DE MONITORAMENTO AGROMETEREOLÓGICO. **Dados metereológicos da cidade de Limeira**. Disponível em: <http://www.agritempo.gov.br/agroclima/sumario?uf=SP>. Acesso em: 20 jul. 2010.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. **Fundamentos de genética**: mutação, reparo do DNA e recombinação. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.311-344.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGÊNESE E TERATOGENESE AMBIENTAL. **2º Programa de comparação interlaboratorial para o teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* – teste de Ames – ensaio Salmonella/microsoma**: relatório técnico. 2009. 22p.

TRAVERSI, D.; DEGAN, R.; DE MARCO, R.; GILLI, G.; PIGNATA, C.; VILLANI, S.; BONO, R. Mutagenic properties of PM_{2,5} urban pollution in the Northern Italy: the nitro-compounds contribution. **Environment International**, v.35, n.6, p.905-910, 2009.

TSUKATANI, H.; TANAKA, Y.; SERA, N.; SHIMIZU, N.; KITAMORI, S.; INOUE, N. Mutagenic activity in roadside soils. **Journal of Toxicological Sciences**, v.27, n.3, p.183-189, 2002.

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A.; RECH, C.M.; SATO, M.I.; CLAXTON, L.D. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the

Salmonella assay and different water extraction procedures. **Chemosphere**, v.54, n.11, p.1589-1597, 2004a.

UMBUZEIRO, G.A.; VARGAS, V.M.F.; FELZENSZWALB, I.; HENRIQUES, J.A.P.; VARANDA, E. **Teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames, ensaio *Salmonella*/microsoma)**. S.l.: SBMCTA, 2004b. 18p. Disponível em: <http://www.sbmcta.org.br/serie-documentos.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2010.

UMBUZEIRO, G.A.; FRANCO, A.; MAGALHÃES, D.; CASTRO, F.J.V.; KUMMROW, F.; RECH, C.M.; CARVALHO, L.R.F.; VASCONCELLOS, P.C. A preliminary characterization of the mutagenicity of atmospheric particulate matter collected during sugar cane harvesting using salmonella/microsome microsuspension assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.49, n.4, p.249-255, 2008a.

UMBUZEIRO, G.A.; FRANCO, A.; MARTINS, M.H.; KUMMROW, F.; CARVALHO, L.; SCHMEISER, H.H.; LEYKAUF, J.; STIBOROVA, M.; CLAXTON, L.D. Mutagenicity and DNA adduct formation of PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH fractions of atmospheric particulate matter from São Paulo, Brazil. **Mutation Research**, v.652, n.1, p.72-80, 2008b.

UMBUZEIRO, G.A.; MACHALA, M.; WEISS, J. Diagnostic tools for effect-directed analysis of mutagens, AhR agonists and endocrine disrupts. In: BRACK, W., org. **Effect-directed analysis of complex environmental contamination**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. v.15, p.70-100. (The handbook of environmental chemistry, 15).

VALAVANIDIS, A.; FIOTAKIS, K.; VLACHOGIANNI, T. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. **Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews**, v.26, n.4, p.339-362, 2008.

VARGAS, V.M.F.; HORN, R.C.; GUIDOBONO, R.R.; MITTELSTAEDT, A.B.; AZEVEDO, I.G. Mutagenic activity of airborne particulate matter from the urban area of Porto Alegre, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, n.2, p.247-253, 1998.

VARGAS, V.M.F. Mutagenic activity as a parameter to assess ambient air quality for protection of the environment and human health. **Mutation Research**, v.544, n.2/3, p.313-319, 2003.

VILLALOBOS-PIETRINI, R.; HERNÁNDEZ-MENA, L.; AMADOR-MUÑOZ, O.; MUNIVE-COLÍN, Z.; BRAVO-CABRERA, J.L.; GÓMEZ-ARROYO, S.; FRÍAS-VILLEGAS, A.; WALISZEWSKI, S.; RAMÍREZ-PULIDO, J.; ORTIZ-MUÑOZ, R. Biodirected mutagenic chemical assay of PM₁₀ extractable organic matter in Southwest Mexico City. **Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.634, n.1/2, p.192-204, 2007.

WAGNER, J.; GRUZ, P.; KIM, S.R.; YAMADA, M.; MATSUI, K.; FUCHS, R.P.; NOHMI, T. The dinB gene encodes a novel E. coli DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. **Molecular Cell**, v.4, n.2, p.281-286, 1999.

WALGRAEVE, C.; DEMEESTERE, K.; DEWULF, J.; ZIMMERMANN, R.; VAN LANGENHOVE, H. Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter: molecular characterization and occurrence. **Atmospheric Environment**, v.44, n.15, p.1831-1846, 2010. [Review].

WATANABE, M.; ISHIDATE Jr., M.; NOHMI, T. A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. **Mutation Research**, v.216, n.4, p.211-220, 1989.

WATANABE, M.; ISHIDATE Jr., M.; NOHMI, T. Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels. **Mutation Research**, v.234, n.5, p.337-348, 1990.

YAMADA, M.; SEDGWICK, B.; SOFUNI, T.; NOHMI, T. Construction and characterization of mutants of *Salmonella typhimurium* deficient in DNA repair of O⁶-methylguanine. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.6, p.1511-1519, 1995.

YAMADA, M.; MATSUI, K.; SOFUNI, T.; NOHMI, T. New tester strains of *Salmonella typhimurium* lacking O⁶-methylguanine DNA methyltransferases and highly sensitive to mutagenic alkylating agents. **Mutation Research**, v.381, n.1, p.15-24, 1997.

Apêndice

Anexos

Anexo A - Modelo de Formulário de Calibração do HI-VOL

FORMULÁRIO DE CALIBRAÇÃO DO AGV PTS (1)							
(PARA USO POSTERIOR COM VALORES MÉDIOS DA TEMPERATURA (T3) E DA PRESSÃO (P3) DURANTE A AMOSTRAGEM)							
DADOS GERAIS DA CALIBRAÇÃO							
AGV PTS Nr: <u>HVP-575</u>				Registrador Nr: <u>RP4-0625</u>			
Local: <u>CESET</u>		Data: <u>06/05/09</u>		Hora: <u>09:00</u>			
P2=	<u>708</u>	mm Hg	T2=	<u>26</u>	C	<u>299</u>	K
Pp = 760 mm Hg		Tp = 298 K (25 C)					
Realizada por <u>Gilberto</u>				Supervisionada por			
DADOS DO CPV (CALIBRADOR PADRÃO DE VAZÃO) (VER CERT. CALIBR.)							
Número do CPV: <u>0291</u>				Data Última Calibração: <u>26/12/03</u>			
Relação (Reta) de Calibração:							
Inclin. a1:		<u>2,894000</u>	Inters. b1:		<u>0,163000</u>	Corr. r1:	<u>0,9990</u>
Para cálculo de Qp na Coluna (4) abaixo, usar a expressão:							
$Qp = (1/a1)((dH(P2/Pp)(Tp/T2))^{0,5-b1})$							
MEDIDAS DA CALIBRAÇÃO							
	1	2	3	4	5	6	
	Placa	dH	*	Qp	D	**	
		cm H2O		m3/min	Deflexão		
	18	28,0	5,0987	1,706	6,80	2,5127	
	13	24,0	4,7205	1,575	5,90	2,3405	
	10	19,0	4,2001	1,395	4,80	2,1111	
	7	13,2	3,5008	1,153	3,10	1,6965	
	5	10,0	3,0471	0,997	2,00	1,3627	
(*) = $(dH(P2/Pp)(Tp/T2))^{0,5}$ (**) = $(D(P2/Pp)(Tp/T2))^{0,5}$							
RELAÇÃO DE CALIBRAÇÃO DO AGV PTS/REGRESSÃO LINEAR - MÍNIMOS QUADRADOS							
$Y = a2X + b2;$ $(D(P2/Pp)(Tp/T2))^{0,5} = a2Qp + b2$							
Inclinação da reta (a2) =			<u>1,6063</u>	Intersepto da reta (b2) =			<u>-0,1879</u>
Coeficiente de correlação (r2) =			<u>0,9952</u>				
PARA USO POSTERIOR NAS AMOSTRAGENS							
$X = (1/a2)(Y - b2);$ $Qp = (1/a2)((D(P3/Pp)(Tp/T3))^{0,5} - b2)$							
Assinatura:							
Data:							

Anexo B – Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: **pgfarma@usp.br**, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

Presidente da CPG/FCF/USP

Anexo C – Currículo Lattes

Débora Kristina Magalhães Alves

Mestranda em Toxicologia Ambiental pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP) possui graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura (2006) e Bacharelado (2007) pelo Centro Universitário Fundação Santo André. Tem experiência nas áreas de Microbiologia, Toxicologia Ambiental com ênfase em Mutagênese e Citotoxicidade e de Imunologia, com ênfase em Biologia Molecular.
(Texto informado pelo autor)

Ultima atualização do currículo em 25/07/2011

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/2606758005305102>

Dados pessoais

Nome Débora Kristina Magalhães Alves

Nome em citações bibliográficas ALVES, D. K. M.

Sexo Feminino

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
Av. Prof. Lineu Prestes, 580
Cidade Universitária
05508-000 - São Paulo, SP - Brasil

Formação acadêmica/Titulação

- 2009** Mestrado em andamento em Programa de Pós-Graduação em Toxicologia. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: A aplicabilidade de combinações seletivas de linhagens *S. typhimurium* na caracterização da mutagenicidade do ar, *Orientador:* Gisela de Aragão Umbuzeiro.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
Palavras-chave: Mutagênese; Material particulado de ar; *Salmonella typhimurium*.
Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Microbiologia.
Grande área: Ciências da Saúde / *Área:* Farmácia / *Subárea:* Análise Toxicológica.
Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Genética.
- 2007 - 2007** Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado. Centro Universitário Fundação Santo André, CUFSA, Brasil.
Título: Expressão de IL-15 e de seu receptor: relação com doença do enxerto contra o hospedeiro..
Orientador: Dra Maria Gerbase de Lima.
- 2003 - 2006** Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura. Centro Universitário Fundação Santo André, CUFSA, Brasil.

Formação complementar

2008 - 2008 Avaliação de Genotoxicidade:. (Carga horária: 32h).
Sociedade Brasileira de Mutagenese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental.

2008 - 2008 Estimativa de Emissões de Poluentes Atmosféricos. (Carga horária: 28h).
Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, CETESB, Brasil.

Atuação profissional**Universidade de São Paulo, USP, Brasil.****Vínculo institucional**

2010 - Atual Vínculo: Mestranda, Enquadramento Funcional: Bolsista, Regime: Dedicção exclusiva.

Atividades

2010 - Atual Atividades de Participação em Projeto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Projetos de pesquisa
[A aplicabilidade de combinações seletivas de linhagens S. typhimurium na caracterização da mutagenicidade de amostras de ar](#)

Centro Universitário Senac, SENAC/SP, Brasil.**Vínculo institucional**

2008 - 2010 Vínculo: Outro (especifique), Enquadramento Funcional: Funcionário, Carga horária: 40

Atividades

2009 - Atual Atividades de Participação em Projeto, Campus Santo Amaro.

Projetos de pesquisa
[Caracterização da Mutagenicidade do Material Particulado de Ar utilizando as novas linhagens YG5161, YG7108 e YG1041 de Salmonella typhimurium](#)

Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.**Vínculo institucional**

2007 - 2007 Vínculo: Outro (especifique), Enquadramento Funcional: Estágio, Carga horária: 40h
Regime: Dedicção exclusiva.

Atividades

01/2007 - 12/2007 Atividades de Participação em Projeto, Departamento de Pediatria.

Projetos de pesquisa
[Expressão de IL-15 e de seu receptor \(IL-15RA\): relação com doença do enxerto contra hospedeiro aguda.](#)

Escola Estadual Sada Umeizwa, E E SADA UMEIZAW, Brasil.

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Professor Eventual, Enquadramento Funcional: Professor de Biologia e Ciências Biológicas, Carga horária: 20

Outras informações Trabalhei como professora eventual ministrando aulas de biologia

Centro Universitário Fundação Santo André, CUFSA, Brasil.

Vínculo institucional

2004 - 2007 Vínculo: Outro, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 6

Outras informações Monitoria de Geologia Ambiental

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, CETESB, Brasil.

Vínculo institucional

2004 - 2006 Vínculo: Outro, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 30, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações Estágio no Setor de Toxicologia Ambiental, no laboratório de Mutagenese e Citotoxicidade (Teste de Ames)

Atividades

01/2006 - 12/2006 Atividades de Participação em Projeto, Laboratório de Mutagenese e Citotoxicidade Ambiental, .

Projetos de pesquisa

[Fontes de variabilidade do Teste Salmonella/microsoma](#)

Projetos de Pesquisa

2010 - Atual A aplicabilidade de combinações seletivas de linhagens *S. typhimurium* na caracterização da mutagenicidade de amostras de ar

Descrição: O material particulado atmosférico é reconhecido como mutagênico. Embora vários compostos já tenham sido identificados nessa matriz, os mesmos não explicam o efeito observado na maioria dos bioensaios realizados. O ensaio de mutagenicidade *Salmonella/microsoma* tem sido amplamente utilizado para a avaliação de amostras atmosféricas o qual é muito sensível na detecção de vários tipos de mutágenos, pois é realizado com diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* na presença e ausência de ativação metabólica exógena. O principal objetivo deste trabalho foi verificar a aplicabilidade da utilização de combinações seletivas de linhagens na caracterização da mutagenicidade de amostras de material particulado total de ar coletado em Limeira, uma cidade do interior do estado de São Paulo sob influência de intenso tráfego, emissões industriais e da agricultura, incluindo o plantio de cana de açúcar. Foram avaliados seis extratos orgânicos obtidos com diclorometano por ultrasonicação, utilizando o método *Salmonella/microsoma* em microssuspensão na presença e ausência de ativação metabólica (mistura S9) em experimentos de dose-resposta, com quantidade máxima de 50 g de material orgânico extraído (MOE) por placa. Os pares de

linhagens utilizados foram: YG1041/TA98, para verificar a presença de nitrocompostos, como 1-nitropireno e/ou aminas aromáticas; YG5161/TA1538, altamente sensível aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) não substituídos como o benzo[a]pireno (BaP); e YG7108/TA1535, para a indicação de agentes alquilantes. Os resultados indicaram que os compostos que podem melhor explicar os efeitos observados são os nitro e/ou aminas aromáticas e não os HPA não substituídos como o BaP. O par YG7108/TA1535 forneceu respostas negativas para todas as amostras. As combinações seletivas de linhagens *S. typhimurium* (YG1041/TA98 e YG5161/TA1538) mostraram-se eficientes na caracterização da mutagenicidade de amostras de ar coletadas na cidade de Limeira, podendo s.

Situação: Em andamento; *Natureza:* Pesquisa.
Integrantes: Gisela de Aragão Umbuzeiro - Integrante / Débora Kristina Magalhães Alves - Coordenador.
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Auxílio financeiro / Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Bolsa.

2009 - 2010

Caracterização da Mutagenicidade do Material Particulado de Ar utilizando as novas linhagens YG5161, YG7108 e YG1041 de *Salmonella typhimurium*

Situação: Em andamento; *Natureza:* Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação (1) / Mestrado acadêmico (1) .
Integrantes: Gisela de Aragão Umbuzeiro - Coordenador / Alcir Vilela Junior - Integrante / Débora Kristina Magalhães Alves - Integrante.
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Auxílio financeiro.

2007 - 2007

Expressão de IL-15 e de seu receptor (IL-15RA): relação com doença do enxerto contra hospedeiro aguda.

Situação: Concluído; *Natureza:* Pesquisa.
Integrantes: Susana Nogueira Diniz - Integrante / Adriano de Moraes Arantes - Integrante / Dra Chloé Camba Musatti - Integrante / Dra Maria Gerbase de Lima - Coordenador / Débora Kristina Magalhães Alves - Integrante.
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa.

2006 - 2006

Fontes de variabilidade do Teste Salmonella/microsoma

Situação: Concluído; *Natureza:* Pesquisa.
Integrantes: Gisela de Aragão Umbuzeiro - Coordenador / Célia Maria Rech - Integrante / Débora Kristina Magalhães Alves - Integrante.
Financiador(es): Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - Remuneração.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biologia Geral.
2. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Farmacologia / Subárea: Toxicologia.
3. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia.
4. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Imunologia.
5. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética.

6. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Mutagênese.

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Produção em C,T & A

Produção bibliográfica

Resumos publicados em anais de congressos

1. BERGAMASSO, A. M. ; ALVES, D. K. M. ; RECH, C. M. ; UMBUZEIRO, G. A. . EMPREGO DE DIFERENTES LINHAGENS DE *Salmonella typhimurium* NO TESTE SALMONELLA/MICROSSOMA PARA INDICAR A CLASSE DE COMPOSTOS MUTAGÊNICOS PRESENTES EM EFLUENTES INDUSTRIAIS.. In: XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2009, Belo Horizonte/MG. Revista Brasileira de Toxicologia. São Paulo : Sociedade Brasileira de Toxicologia, 2009. v. 22. p. 79-79.

Apresentações de Trabalho

1. ★ ALVES, D. K. M. ; ALBUQUERQUE, A. F. ; ALMEIDA, G. ; UMBUZEIRO, G. A. . A utilização de novas linhagens na avaliação da mutagenicidade do ar. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Eventos

Participação em eventos

1. XI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia - Ecotox.A utilização de novas linhagens na avaliação da mutagenicidade do ar. 2010. (Congresso).
2. Seminário Novas Tendências em Ecotoxicidade (New Trends in Ecotoxicity). 2008. (Seminário).
3. IV Workshop de Gestão Integrada: Riscos e Prevenção no Trabalho. 2008. (Outra).
4. XV Congresso de Iniciação Científica - PIBIC.Expressão de IL-15 e de seu receptor (IL-15RA): relação com doença do enxerto contra hospedeiro aguda.. 2007. (Congresso).
5. XV Congresso de Iniciação Científica - PIBIC.Expressão de IL-15 e de seu receptor (IL-15RA): relação com doença do enxerto contra hospedeiro aguda.. 2007. (Congresso).
6. 21º Workshop Temático do CAT/CEPID-FAPESP - Análise de Expressão Gênica. 2007. (Outra).
7. Semana de Ciências - Centro Universitário Fundação Santo André.Expressão de IL-15 e de seu receptor (IL-15RA): relação com doença do enxerto contra hospedeiro aguda.. 2007. (Outra).
8. Seminário de Transferência de Conhecimentos: "Avanços na Avaliação da Qualidade Ambiental - Novos Instrumentos Analíticos para Monitoramento e Controle". 2006. (Seminário).
9. "Seminário Latino-americano sobre a prevenção e controle da contaminação do solo e das águas subterrâneas". 2006. (Seminário).
10. Satélite do VII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental - "New in the Genetic Toxicology". 2005. (Outra).

Anexo D – Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 6720495/1 - Débora Kristina Magalhães Alves

Email: debora.kalves@usp.br
Data de Nascimento: 27/04/1981
Cédula de Identidade: RG - 32.966.531-5 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Ciências Biológicas - Fundação Santo André - São Paulo - Brasil - 2008

Curso: Mestrado
Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula: 06/02/2009
Início da Contagem de Prazo: 06/02/2009
Data Limite: 06/08/2011
Orientador: Prof(a). Dr(a). Silvia Berlanga de Moraes Barros - 06/02/2009 a 26/10/2009 E.Mail: sbarros@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Gisela de Aragão Umbuzeiro - 27/10/2009 até o presente. E.Mail: giselau@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 21/10/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 31/01/2011
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 06/02/2009
 Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2011

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2011

Impresso em: 25/07/11 11:37:26

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 6720495/1 - Débora Kristina Magalhães Alves

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5802-2/1	Tópicos Avançados em Toxicologia I	09/03/2009	21/06/2009	30	2	80	A	N	Concluída
FBC5752-1/3	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	02/06/2009	06/07/2009	45	0	0	-	N	Turma cancelada
FBC5784-2/2	Tópicos Avançados em Toxicologia II	17/08/2009	29/11/2009	30	2	90	A	N	Concluída
FBC5752-2/1	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	21/08/2009	24/09/2009	45	3	100	A	N	Concluída
FBC5813-2/2	Aplicações de Cromatografia em Análises Toxicológicas	16/11/2009	20/12/2009	60	0	0	-	N	Turma cancelada
HSA5715-4/2	Amostragem de Análise de Poluentes Atmosféricos (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	01/03/2010	14/06/2010	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5729-5/2	Fundamentos Básicos da Avaliação da Toxicidade a Substâncias Químicas	02/03/2010	22/03/2010	75	5	77	A	N	Concluída
ICA5756-3/4	Teoria e Prática da Pesquisa Interdisciplinar Ambiental (Universidade de São Paulo)	15/03/2010	27/06/2010	150	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
HSA5721-5/4	Controle da Poluição do Ar (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	02/08/2010	15/11/2010	60	4	93	A	N	Concluída
FBC5803-1/2	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	03/08/2010	16/08/2010	30	2	100	A	N	Concluída
SCS5703-1/1	Metodologia e Divulgação de Trabalho Científico (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	10/08/2010	07/12/2010	60	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
BTC5761-1/3	Técnicas Atuais na Abordagem de Biologia do Desenvolvimento (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	01/09/2010	09/11/2010	90	6	90	A	N	Concluída
FBA5728-3/2	Aprimoramento Didático (1)	12/04/2011	09/05/2011	60	4	85	A	S	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	25	25	32
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	25	25	32

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Disciplina(s) cursada(s) voluntariamente pelo(a) candidato(a) após ter cumprido as exigências regulamentares.

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2011

Impresso em: 25/07/11 11:37:26