



**DANIEL ALEXANDRE MORALES**

**ENTENDENDO A MUTAGENICIDADE DE AMOSTRAS DE  
MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO**

*UNDERSTANDING THE MUTAGENICITY OF ATMOSPHERIC  
PARTICULATE AIR SAMPLES*

**LIMEIRA  
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE TECNOLOGIA

DANIEL ALEXANDRE MORALES

**ENTENDENDO A MUTAGENICIDADE DE AMOSTRAS DE  
MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO**

Orientadora: Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro

*UNDERSTANDING THE MUTAGENICITY OF ATMOSPHERIC  
PARTICULATE AIR SAMPLES*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia.

Área de concentração: Tecnologia e Inovação.

Dissertation submitted to the Master Course, Faculty of Technology, State University of Campinas, as a requirement for obtaining the title of Master of Technology.

Area of concentration: Technology and Innovation.

**LIMEIRA, 2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR VANESSA EVELYN COSTA CRB-8/8295  
BIBLIOTECA UNIFICADA FT/CTL  
UNICAMP

Morales, Daniel Alexandre, 1981-  
M792e Entendendo a mutagenicidade de amostras de material  
particulado atmosférico / Daniel Alexandre Morales. -  
Limeira, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Gisela de Aragão Umbuzeiro.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Tecnologia.

1. Testes de mutagenicidade. 2. Ar. 3. Ar – poluição.  
4. Compostos orgânicos. I. Umbuzeiro, Gisela de Aragão.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Tecnologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Understanding the mutagenicity of atmospheric particulate air samples.

Palavras-chave em inglês (Keywords):

- 1- Mutagenicitys tests.
- 2- Air.
- 3- Air – pollution.
- 4- Organic compounds.

Área de concentração: Tecnologia e Inovação

Titulação: Mestre em Tecnologia

Banca examinadora: Gisela de Aragão Umbuzeiro, Simone Andréa Pozza, Fábio Kummrow.

Data da Defesa: 05-02-2013

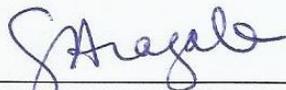
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM TECNOLOGIA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: TECNOLOGIA E INOVAÇÃO**

Entendendo a mutagenicidade de amostras de material particulado atmosférico

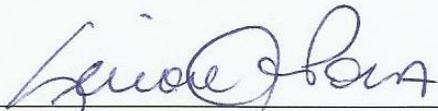
**Autor:** Daniel Alexandre Morales

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:



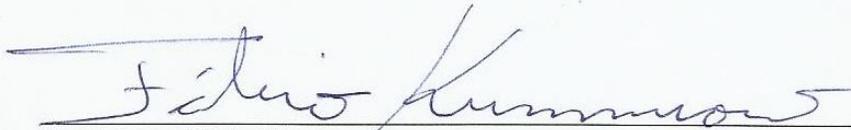
---

Prof. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro  
FT/UNICAMP



---

Prof. Dra. Simone Andréa Pozza  
FT/UNICAMP



---

Prof. Dr. Fábio Kummrow  
UNIFESP

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
que mesmo não entendendo o que eu faço  
me compreendem e apoiam.*

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora, Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro pela confiança, incentivo, amizade, ajuda e oportunidades criadas, obrigado por me orientar e ensinar.

Ao meu pai José e a minha mãe Maria Inês pelo amor e confiança incondicional, por sempre acreditar e me apoiar.

Ao meu irmão Danilo pelo apoio e força em todos os momentos e a minha cunhada Lívia.

À Renata, que ao início do trabalho era amiga e hoje, namorada, obrigado pela confiança e apoio.

Aos amigos de fora dos portões da faculdade, pela amizade e pelos momentos de distração.

Aos amigos de dentro e fora do laboratório pelas conversas formais e informais.

Às amigas Ádria, Anjaina e Josiane pelo apoio dado e ajuda na elaboração do trabalho.

Aos amigos Gilberto e Geraldo pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Fábio Kummrow pela colaboração para realização do trabalho e pela amizade.

À Dra. Lilian Rothschild e a Me. Kely F. Souza pela cooperação para a realização desse trabalho.

Aos professores Dra. Simone A. Pozza e Dr. Fábio Kummrow, que participaram da minha banca de qualificação pela contribuição para o trabalho.

À Karen e Fátima da secretaria de pós-graduação pelas dúvidas solucionadas.

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

## RESUMO

O fracionamento de uma mistura complexa, como o extrato orgânico do material particulado de ar, com base nas diferentes características físicas e químicas dos seus componentes acoplada a testes de mutagenicidade e análises cromatográficas, vem sendo um procedimento útil na elucidação de quais substâncias estão presentes na mistura. Este trabalho foi realizado em colaboração com outro grupo de pesquisa em um projeto temático financiado pela FAPESP, e seu objetivo foi estudar a mutagenicidade de frações de extratos orgânicos de material particulado de ar, utilizando ensaio *Salmonella*/microsoma em microssuspensão com os pares de linhagens TA98/YG1041, TA98/TA1538 e TA1538/YG5161 de *Salmonella typhimurium* que apresentam diferentes sensibilidades para grupos específicos de compostos. Também foi objetivo do trabalho comparar as potências mutagênicas obtidas para cada uma das frações com os níveis de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos analisados pelos pesquisadores do projeto temático. Foram avaliadas três frações, Nitro-HPA, Oxi-HPA e HPA 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 10 m<sup>3</sup> por placa; também foi avaliada a contribuição na mutagenicidade dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos analisados para cada fração. De acordo com a contribuição na mutagenicidade dos compostos identificados, foi possível inferir que esses não explicam totalmente a mutagenicidade observada para algumas linhagens, e que outros compostos podem estar causando esse efeito. A comparação dos perfis observados entre as frações analisadas e os compostos químicos encontrados na literatura utilizando os pares de linhagens foi capaz de fornecer alguns grupos que podem justificar a mutagenicidade observada, porém, faltam estudos com compostos químicos puros. Um estudo utilizando os pares de linhagens com compostos químicos pode ajudar a identificar e entender o perfil das respostas observadas em amostras ambientais de material particulado de ar, bem como em outras amostras ambientais, especialmente em análises químicas direcionadas pelo efeito biológico (ADEB).

Palavras chave: Testes de mutagenicidade; Ar; Ar – poluição; Compostos orgânicos.

## ABSTRACT

The fractionation of a complex mixture based on different physical and chemical characteristics of its components coupled to mutagenicity testing and chromatographic analyzes have been useful in elucidating what substances are present in the mixture. This work was performed in collaboration with another research group in a broad thematic project funded by FAPESP. Samples were collected extracted and prepared by the participants and in this work the objective was to study the mutagenicity of fractions of organic extracts of air particulate matter using Salmonella/microsome microsuspension in combination with selective pair of strains TA98/YG1041, TA98/TA1538 and TA1538/YG5161 of *Salmonella typhimurium* which have different sensitivities to specific types of compounds. Another objective was to compare the mutagenic potencies obtained for each of the fractions with the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons analyzed by the researchers of the thematic project. We evaluated three fractions, named as Nitro-PAH, Oxy-PAH and PAH, using the Salmonella/microsome microsuspension protocol in the presence and absence of metabolic activation (S9) in dose-response experiments, with maximum of 10 m<sup>3</sup> per plate, was also evaluated the contribution of mutagenicity in polycyclic aromatic hydrocarbons for each fraction analyzed. According to the contribution in the mutagenicity of the compounds identified, it was possible to infer that these do not fully explain the mutagenicity observed for some strains, and that other compounds may be causing this effect. The comparison of the profiles observed between fractions and analyzed the chemical compounds found in the literature using the pairs of strains was able to provide some groups which may justify the mutagenicity observed, however, there are few studies with pure chemicals. A study using pairs of strains with single chemicals could help in the identification and understanding of the profile of the responses seen atmospheric air particulate samples as well as in other environmental samples, and so assist chemical analysis studies in effect directed analysis (EDA).

Keywords: Mutagenicity tests; Air; Air – pollution; Organic compounds.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Distribuição em porcentagem da utilização do ensaio Salmonella/microsossoma em amostras de ar. \_\_\_\_\_ 5
- Figura 2 - Amostrador de grande volume para partículas totais em suspensão. \_\_\_\_\_ 16
- Figura 3 - Protocolo esquemático do teste Salmonella/microsossoma em microssuspensão. \_\_\_ 22
- Figura 4 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as frações para o par de linhagens YG1041/TA98 na ausência de S9. Os dados foram apresentados em escala logarítmica. \_\_\_\_\_ 32
- Figura 5 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as frações para o par de linhagens YG1041/TA98 na presença de S9. Os dados foram apresentados em escala logarítmica. \_\_\_\_\_ 33
- Figura 6 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as frações para o par de linhagens TA98/TA1538 na ausência de S9. Os dados foram apresentados em escala logarítmica. \_\_\_\_\_ 35
- Figura 7 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as frações para o par de linhagens YG5161/TA1538 na ausência de S9. Os dados foram apresentados em escala logarítmica. \_\_\_\_\_ 37

Figura 8 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as frações para o par de linhagens YG5161/TA1538 na presença de S9. Os dados foram apresentados em escala logarítmica. \_\_\_\_\_ 38

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Exemplos de respostas no ensaio Salmonella/microsossoma de amostras ambientais que poderiam explicar os efeitos observados para as classes de agentes mutagênicos. \_\_\_\_\_ 9
- Tabela 2 - Características genéticas das linhagens de Salmonella typhimurium empregadas nesse trabalho. \_\_\_\_\_ 13
- Tabela 3 - Concentração dos compostos identificados na fração HPA. \_\_\_\_\_ 18
- Tabela 4 - Concentração dos compostos identificados na fração Nitro-HPA. \_\_\_\_\_ 18
- Tabela 5 - Concentração dos compostos identificados na fração Oxi-HPA. \_\_\_\_\_ 19
- Tabela 6 - Controle positivo utilizado para cada linhagem de Salmonella typhimurium utilizada neste trabalho. \_\_\_\_\_ 23
- Tabela 7 - Potência mutagênica (revertentes.m<sup>-3</sup>) da fração Nitro-HPA com as linhagens TA98, YG1041 e TA1538 na ausência e presença de ativação metabólica (S9). \_\_\_\_\_ 26
- Tabela 8 - Contribuição dos compostos químicos, em porcentagem, na mutagenicidade da fração Nitro-HPA na ausência de S9. \_\_\_\_\_ 27
- Tabela 9 - Comparação da potência mutagênica (revertentes.m<sup>-3</sup>) da fração Oxi-HPA entre as linhagens TA98, YG1041 e TA1538 na ausência e presença de ativação metabólica (S9). \_ 28
- Tabela 10 - Comparação da potência mutagênica (revertentes.m<sup>-3</sup>) da fração HPA entre as linhagens TA98, TA1538 e YG5161 na ausência e presença de ativação metabólica (S9). \_ 30

Tabela 11 - Contribuição dos compostos químicos, em porcentagem, na mutagenicidade da fração HPA na ausência de S9. \_\_\_\_\_ 31

## LISTA DE TABELAS DO APÊNDICE

Tabela A 1 - Resultados para o ensaio Salmonella com a fração Nitro-HPA. _____	47
Tabela A 2 - Resultados para o ensaio Salmonella com a fração Oxi-HPA. _____	49
Tabela A 3 - Resultados para o ensaio Salmonella com a fração HPA. _____	51
Tabela A 4 - Potência mutagênica (rev.m-3) para as frações estudadas. _____	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADEB</b>	Análises químicas direcionadas pelo efeito biológico
<b>AGV</b>	Amostrador de grande volume
<b>AT</b>	Acetiltransferase
<b>CO</b>	Monóxido de carbono
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EDA</b>	<i>Effect directed analysis</i>
<b>ENNG</b>	N-Etil-N'-nitrosoguanidina
<b>EPA</b>	<i>Environmental Protection Agency</i>
<b>FAPESP</b>	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
<b>HPA</b>	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>LEAL</b>	Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental Prof. Dr. Abílio Lopes
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídica
<b>LQ</b>	Limite de quantificação
<b>MP</b>	Material particulado
<b>NIST</b>	<i>National Institute of Standards of Technology</i>
<b>NR</b>	Nitroreductases

<b>OAT</b>	O-acetiltransferases
<b>O<sub>3</sub></b>	Ozônio
<b>PTS</b>	Partículas Totais em Suspensão
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo

# SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE TABELAS DO APÊNDICE	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Material particulado atmosférico	4
2.2 Bioensaios para detecção de efeitos mutagênicos	5
2.3 Limitações dos bioensaios para identificação de mutágenos	6
2.4 Ensaio Salmonella/microsoma	10
2.5 Especificidade dos mutantes de Salmonella typhimurium	11
3 OBJETIVO	14
4 MATERIAIS E MÉTODOS	15

4.1 Área de estudo e coleta de amostras	15
4.2 Preparo da amostra	16
4.2.1 Procedimento de extração orgânica	17
4.2.2 Fracionamento dos extratos orgânicos e análises químicas	17
4.3 Ensaio Salmonella/microsoma	19
4.3.1 Preparo das soluções e meio de cultura	19
4.3.2 Crescimento das culturas	20
4.3.3 Protocolo do método em microsuspenção	20
4.6.4 Controles positivos e negativos	22
4.7 Interpretação de resultados	23
4.8 Critérios de avaliação e expressão de resultados	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.3 Resultados de mutagenicidade	25
5.3.1 Fração Nitro-HPA	25
5.3.2 Fração Oxi-HPA	28
5.3.3 Fração HPA	29

5.4 Comparação da mutagenicidade observada com dados da literatura _____	32
6 CONCLUSÃO _____	40
7 RECOMENDAÇÃO _____	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	41
APÊNDICE _____	47

# 1 INTRODUÇÃO

O material particulado do ar, especialmente das grandes cidades, contém vários compostos cancerígenos e mutagênicos capazes de induzir efeitos sobre a saúde em seres humanos expostos por via inalatória. Devido à presença desses compostos, cada vez mais trabalhos evidenciam que a exposição por longos períodos às partículas finas pode representar um risco à saúde, pois elas contribuem para a incidência de várias doenças, incluindo o câncer de pulmão e doenças cardiorrespiratórias (POPE III et al., 2002; KREWSKI et al., 2005).

Para Claxton et al. (2004), a mutagenicidade está relacionada, aproximadamente, a 500 compostos já identificados que pertencem a diversas classes químicas diferentes, mas a presença desses não explica totalmente o efeito mutagênico associado ao material particulado de ar. Dentre eles, os compostos mais monitorados são os chamados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), porém eles podem não ser os responsáveis pela grande maioria da mutagenicidade associada às partículas do ar. Conforme Claxton et al. (2004), a maioria dessa mutagenicidade está associada com compostos de alta ou moderada polaridade, como os nitroaromáticos, aminas aromáticas e cetonas aromáticas. Umbuzeiro et al. (2008a), ao estudar regiões onde ocorre queima de cana de açúcar, evidenciaram que as frações mais polares analisadas foram as mais mutagênicas, e que o efeito observado comparando as repostas entre as linhagens TA98 e YG1041 sem o uso de ativação metabólica foi causado por nitrocompostos.

O material particulado do ar é uma mistura complexa. A quantificação e a qualificação dessas diferentes substâncias se tornam um problema quando se trata de avaliar a exposição e o efeito sofrido por uma população ou meio ambiente (HANNIGAN et al., 1998; PEREIRA et al., 2010). Nesses casos, as análises químicas direcionadas pelo efeito biológico (ADEB), do inglês *effect directed analysis (EDA)*, têm sido uma ferramenta muito utilizada para auxiliar na identificação de compostos orgânicos tóxicos/genotóxicos presentes em misturas complexas (UMBUZEIRO, MACHALA, 2011). Essa técnica envolve separar uma amostra em frações que contenham produtos químicos orgânicos de funcionalidades e polaridades semelhantes. Em seguida, as frações são testadas em bioensaios para determinar sua potência mutagênica e, assim, ser direcionada à análise química (HANNIGAN et al., 1998). O fracionamento de uma mistura

complexa, com base nas diferentes características físicas e químicas dos seus componentes, vem sendo um procedimento muito útil na elucidação de quais são suas estruturas químicas e, dessa forma, torna-se possível avaliar os seus impactos à saúde humana e ambiental (CANEPARI, 2010).

Bioensaio ou ensaio biológico é um termo utilizado quando se estuda efeitos de uma substância em um órgão isolado ou em um organismo vivo. Esse tipo de ensaio está sendo utilizado para avaliar a presença de compostos biologicamente ativos em misturas complexas. A utilização de um bioensaio fornece informações valiosas sobre a identificação do perigo ao qual a população está exposta, permitindo comparações toxicológicas e a identificação das principais classes de compostos químicos presentes nas amostras, auxiliando na avaliação de risco à saúde humana em programas de monitoramento da qualidade do ar (CLAXTON; WOODALL Jr., 2007).

Claxton e Woodall Jr. (2007) observaram que o ensaio Salmonella/microsoma tem sido o mais utilizado dentre os ensaios de mutagenicidade utilizados para avaliação da poluição do ar. Esse ensaio tem sido uma ferramenta útil para comparar a atividade genotóxica entre diferentes regiões ao redor do mundo (CLAXTON et al., 2004), incluindo regiões onde ocorre a queima da cana de açúcar (UMBUZEIRO et al., 2008a).

Alves (2011) avaliou a aplicabilidade de combinações seletivas de linhagens de *Salmonella typhimurium*, do ensaio Salmonella/microsoma em microsusensão, na caracterização da mutagenicidade do material particulado de ar no município de Limeira, mesmo local de estudo do presente trabalho. As combinações seletivas de linhagens de *S. typhimurium* (YG1041/TA98, YG5161/TA1538 e YG7108/TA1535) mostraram-se eficientes na caracterização das classes de compostos responsáveis pela mutagenicidade das amostras estudadas. Com a resposta observada para o par YG1041/TA98, foi possível inferir que os nitrocompostos e/ou aminas aromáticas são os principais responsáveis pela mutagenicidade detectada nas amostras estudadas, a resposta com a YG5161/TA1538 indicou que os HPA não substituídos, como o benzo[a]pireno, não são os principais responsáveis pelo efeito. Já a resposta com o par YG7108/TA1535 indicou que os agentes alquilantes, se presentes, não estão em concentrações suficientes para serem detectados nas condições do ensaio.

Ampla revisão sobre o estudo da mutagenicidade de amostras de ar foi publicado, concluindo-se que a combinação de extração/fracionamento, análise química e o ensaio Salmonella/microsoma é uma abordagem importante para a caracterização toxicológica de agentes mutagênicos no ar, e que mais estudos com as frações mais polares devem ser realizados (MARVIN et al., 2007; UMBUZEIRO, MACHALA, 2011).

Esse estudo foi realizado em cooperação com o grupo da Dr<sup>a</sup>. Lilian Rothschild do Instituto de Química da Universidade de São Paulo - USP. As coletas do material particulado de ar foram realizadas pelos grupos de pesquisa participantes de um amplo projeto Temático financiado pela FAPESP. A extração, o fracionamento e a caracterização química de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos substituídos e não substituídos foram realizados pela aluna de doutorado Kely F. Souza.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Material particulado atmosférico

Sob a denominação geral de material particulado atmosférico se encontra um conjunto de poluentes constituído de poeiras, fumaças e todo tipo de material sólido e líquido que se mantém suspenso na atmosfera por causa de seu pequeno tamanho. As principais fontes de emissão de particulado para a atmosfera são: veículos automotores, processos industriais, queima de biomassa, ressuspensão de poeira do solo, entre outros. O material particulado pode também se formar na atmosfera a partir de gases, como dióxido de enxofre, óxidos de nitrogênio e compostos orgânicos voláteis, que são emitidos principalmente em atividades de combustão, transformando-se em partículas como resultado de reações químicas no ar (CETESB, 2012).

O material particulado (MP) é capaz de atingir diferentes áreas do trato respiratório humano, de acordo com os diferentes tamanhos de diâmetro aerodinâmico das partículas. Quando estas apresentam diâmetro acima de 10  $\mu\text{m}$ , são retidas pelo trato respiratório superior, em especial pelo nariz. Partículas de diâmetro entre 2,5 e 10  $\mu\text{m}$  (MP10) atingem o trato respiratório inferior e as com diâmetro abaixo de 2,5  $\mu\text{m}$  (MP2,5), os bronquíolos e alvéolos pulmonares, neles se alojando e, dessa forma, há possibilidade de causar doenças respiratórias e inflamações (LADEN et al., 2000).

Além dos efeitos deletérios sobre a saúde, provocados pelos gases poluentes, as partículas suspensas em atmosferas urbanas poluídas também representam um problema de saúde pública. Estudos epidemiológicos mostram uma associação entre quantidades elevadas de partículas no ar a um aumento de problemas, como asma, bronquite crônica, tosse crônica, doenças respiratórias e acidentes vasculares cerebrais (SQUADRITO et al., 2001).

Gouveia et al. (2006) citam inúmeros estudos que têm encontrado associações significativas entre níveis diários de material particulado inalável com diâmetro  $\leq 10 \mu\text{m}$  (PM10), monóxido de carbono (CO), ozônio (O<sub>3</sub>) e outros poluentes, que podem causar uma série de efeitos na saúde da população (CONCEIÇÃO et al, 2001; DAUMAS et al., 2004), passando por

adoecimentos para causas específicas, até malformações congênitas (RITZ et al., 2002) ou menor ganho de peso durante a gestação (GOUVEIA et al., 2004).

## 2.2 Bioensaios para detecção de efeitos mutagênicos

Os ensaios utilizados para avaliar atividade mutagênica são divididos pela capacidade de detecção do tipo de mutação, que pode ser mutações de ponto ou de aberrações cromossômicas. Em geral, os testes que detectam alterações cromossômicas são altamente especializados, porém consomem muito tempo, o que torna tal aplicação relativamente limitada em estudos de análises químicas direcionadas pelo efeito biológico (UMBUZEIRO, MACHALA, 2011).

Há uma grande gama de ensaios que detectam mutagenicidade/genotoxicidade em amostras de ar, porém a utilização do ensaio Salmonella/microsossoma tem sido o mais utilizado (CLAXTON; WOODALL Jr., 2007). A Figura 1 ilustra a distribuição do uso de ensaios que detectam mutagenicidade/genotoxicidade em amostras de ar.

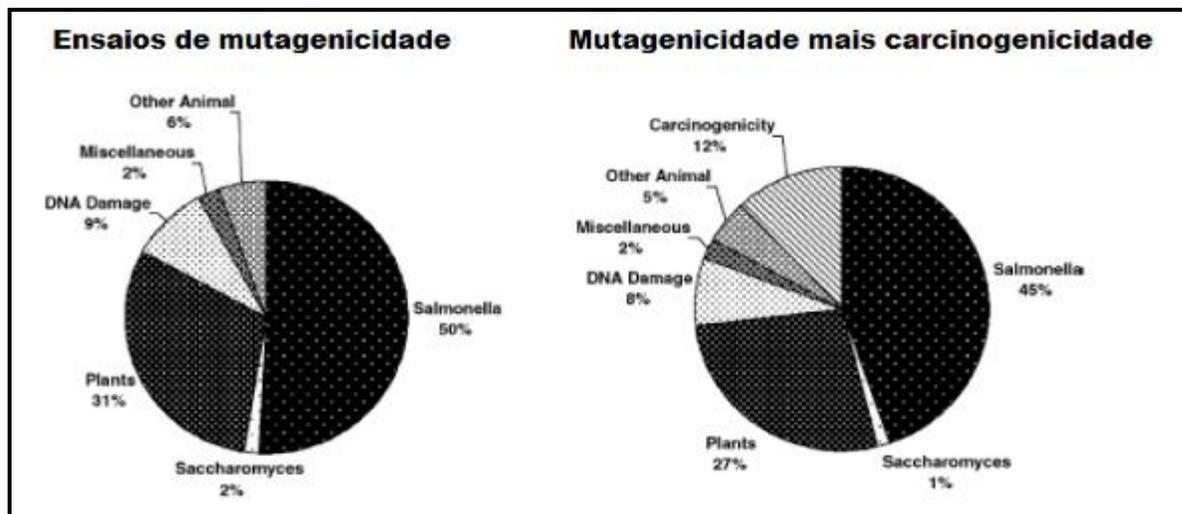


Figura 1 - Distribuição em porcentagem da utilização do ensaio Salmonella/microsossoma em amostras de ar. (CLAXTON; WOODALL Jr., 2007).

O ensaio de Salmonella/microsossoma detecta mutações de ponto e quando combinado com um fracionamento químico de extratos orgânicos pode ser uma ferramenta útil na identificação de classes de compostos mutagênicos. O teste provou-se sensível, identificando alguns compostos na ordem de picogramas, como, por exemplo, o 3-nitrobenzantrona (MARVIN et al., 2007).

O ensaio detecta mutágenos que interajam diretamente com o DNA. Com a utilização de um sistema exógeno, fornecido pela enzima do citocromo P450 do fígado de rato, o teste é capaz de identificar mutágenos que precisam de ativação metabólica para se tornar ativos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

### **2.3 Limitações dos bioensaios para identificação de mutágenos**

Segundo Claxton e Woodall Jr. (2007), a maioria dos trabalhos publicados utiliza um número mínimo de linhagens, alguns autores avaliam o estudo utilizando apenas a TA98 como uma única linhagem. Embora essa linhagem possa responder com resultados positivos para agentes mutagênicos presentes em amostras de ar, a utilização de outras linhagens como, por exemplo, a TA100 ou uma YG1041, permite uma melhor avaliação das classes de compostos e atividade mutagênica. A diferença de sensibilidade das linhagens está associada principalmente à produção de diferentes tipos e níveis de enzimas de biotransformação e expressão de diferentes sistemas de reparo de DNA, assim, o uso de combinações de linhagens com sensibilidades diferentes a distintas classes de agentes mutagênicos, pode indicar os principais compostos presentes em amostras ambientais (CLAXTON et al., 2010; UMBUZEIRO, MACHALA, 2011).

O emprego de apenas uma linhagem especializada, como as YG sensíveis a determinados compostos, por exemplo, nitroaromáticos, pode levar a uma má interpretação dos resultados, caso outras linhagens, bioensaios ou análises químicas não forem utilizadas em conjunto na interpretação e discussão dos resultados (CLAXTON, WOODALL Jr., 2007).

Claxton e Woodall Jr. (2007) exemplifica como apenas a utilização da YG1024 pode gerar uma avaliação errônea dos resultados. A YG1024 é uma linhagem especializada e altamente sensível a compostos nitroaromáticos, porém utilizá-la apenas na avaliação pode vir a

mascarar uma resposta para hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Ainda segundo Claxton e Woodall Jr. (2007), para se entender a atividade mutagênica e o comportamento de uma matriz complexa, a utilização de diversas linhagens é fundamental para o entendimento do efeito causado por diferentes compostos químicos.

Com a utilização de linhagens seletivas, é possível identificar as classes de mutágenos presentes em diferentes amostras. Kummrow et al. (2003) utilizando uma combinação de linhagens de *Salmonella* YG1041 e TA98 para avaliar a mutagenicidade e procedimentos de extração com resina XAD4 e blue rayon com capacidade seletiva para estruturas policíclicas planares, foram capazes de distinguir contaminantes industriais de derivados por produtos gerados durante o tratamento de água. A resposta observada com o aumento pela YG1041 em relação a TA98 e as diferenças nas respostas com e sem ativação metabólica indicou que a classe de compostos responsáveis pela fonte de mutagenicidade do rio era a de nitroaromáticos primários.

Umbuzeiro et al. (2004) estudando um rio contaminado com corantes azóicos, utilizou a combinação das seguintes linhagens de *Salmonella*: YG1041, YG1042, TA98 e TA100. Os procedimentos de extrações usados foram XAD4 e blue rayon. A mutagenicidade detectada, com respostas elevadas para as linhagens YG, sugeriu que nitroaromáticos e/ou aminas aromáticas estavam causando a mutagenicidade. As respostas positivas para os extratos de blue rayon indicaram que compostos mutagênicos policíclicos estavam presentes nas amostras.

Alves (2011) avaliou a aplicabilidade de combinações de linhagens seletivas de *Salmonella typhimurium* em extratos orgânicos de amostras de material particulado de ar, utilizando o método de extração por ultrasonificação com diclorometano. Os resultados obtidos indicaram que os compostos que podem melhor explicar os efeitos observados são os nitro e/ou aminas aromáticas, respostas obtidas a partir da avaliação dos pares YG1041/TA98, e não os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos não substituídos, pela avaliação dos pares YG5161/TA1538. O par YG7108/TA1535 forneceu respostas negativas para todas as amostras indicando a não presença de agentes alquilantes, ou em concentrações não detectáveis pelo método utilizado. Alves (2011) conclui que a utilização das combinações seletivas de linhagens *S. typhimurium* (YG1041/TA98 e YG5161/TA1538) mostraram-se eficientes na caracterização da mutagenicidade de amostras de ar, podendo ser utilizadas como uma importante ferramenta de

auxílio do ensaio Salmonella/microsoma em microsuspenção em estudos de análises químicas direcionadas pelo efeito biológico (ADEB).

A Tabela 1 apresenta exemplos de como avaliar o efeito observado para as diferentes classes de mutágenos a partir da resposta com as diferentes linhagens utilizadas.

Tabela 1 - Exemplos de respostas no ensaio Salmonella/microsossoma de amostras ambientais que poderiam explicar os efeitos observados para as classes de agentes mutagênicos (MATSUI et al., 2006; UMBUZEIRO, MACHALA, 2011)

<b>Resposta no ensaio Salmonella/microsossoma</b>	<b>Possíveis compostos para a mutagenicidade observada</b>
Resposta positiva nas frações menos polares, com respostas semelhantes para TA98 e YG1041; com S9 <sup>a</sup>	HPA não substituídos como benzo[a]pireno
Resposta positiva para frações mais polares com e sem S9 para TA98 e aumento da resposta com YG1041, às vezes com uma resposta muito reduzida quando S9 é adicionado	Nitrocompostos como nitroaminoazobenzenos, nitrobenzantrons, nitropirenos
Resposta positiva para frações mais polares principalmente com S9 para TA98 e um aumento para a YG1041	Aminas aromáticas como aminoazobenzeno, benzidina e naftilaminas
Maior mutagenicidade com a linhagem YG5161 quando comparado com a TA98 e TA1538	Derivados de Benzo[a]pireno exceto para 3-metilcolantreno, 1-AA e 2-AA
Mutagenicidade igual entre a TA98 e YG5161	Derivados de HPA exceto para ENNG
Mutagenicidade igual para TA98, TA1538 e YG5161	Aminas aromáticas, exceto para 4-NQO

Notas: a – ativação metabólica; 1-AA = 1-aminoantraceno; 2-AA = 2-aminoantraceno; ENNG = N-Etil-N'-nitrosoguanidina; 4-NQO = 4-nitroquinolina-1-óxido.

## 2.4 Ensaio Salmonella/microsoma

Em 1971, Ames e Yamasaki publicaram os princípios do ensaio de mutagenicidade Salmonella/microsoma empregando mutantes de *Salmonella typhimurium*, deficientes na síntese do aminoácido histidina, para avaliar o potencial mutagênico de compostos químicos. Entretanto, sabe-se que muitos compostos necessitam ser metabolizados antes de interagirem com o material genético. Assim, o impacto desse ensaio, e o seu significado na definição de mutagênese em relação ao processo de carcinogênese, apenas ficou evidente após os trabalhos de Malling et al. (1973), que associaram o sistema de metabolização de mamíferos *in vitro* ao ensaio.

O procedimento do ensaio foi inicialmente descrito pelo grupo do Dr. Bruce Ames, Califórnia (AMES, YAMASAKI, 1971; AMES et al., 1973a; 1973b; MARON, AMES, 1983), discutido internacionalmente e recentemente revisado por Mortelmans e Zeiger (2000).

O ensaio pode ser realizado por vários protocolos, sendo geralmente empregados os métodos de incorporação em placas e de pré-incubação (MARON, AMES, 1983), ou ainda, de microsusensão (KADO et al., 1983), que apresenta uma sensibilidade maior que o teste tradicional (UMBUZEIRO, VARGAS, 2003). Várias linhagens com sensibilidade específica a determinadas classes de substâncias têm sido selecionadas. Associando linhagens sensíveis, constante aprimoramento nos protocolos e diferentes condições de metabolização, foi possível elevar a especificidade do teste na identificação de compostos potencialmente mutagênicos (UMBUZEIRO, VARGAS, 2003).

Estudos realizados por Ames et al. (1973a, 1973b) e McCann et al. (1975) mostraram correlação qualitativa entre resultados de testes usando Salmonella/microsoma e respostas a ensaios de avaliação da atividade carcinogênica. Claxton et al. (1988) e Ashby e Tennant (1991) evidenciaram que essa correlação é dependente da classe química do composto, dos mecanismos de mutagênese envolvidos e do processo de metabolização. Muitos trabalhos têm avaliado essa relação estudando mecanismos de diferentes grupos de substâncias (UMBUZEIRO, VARGAS, 2003).

## 2.5 Especificidade dos mutantes de *Salmonella typhimurium*

Cada linhagem possui uma mutação específica no gene responsável pela síntese do aminoácido histidina bem como diferentes alterações nos sistemas de reparo e capacidades metabólicas, sendo assim, responde diferentemente às variadas classes de compostos químicos. De acordo com a construção e características de cada linhagem, podemos utilizar “pares”, e através das respostas obtidas, identificar quais os possíveis compostos presentes nas amostras (UMBUZEIRO, MACHALA, 2011).

Algumas das linhagens possuem alterações genéticas adicionais que lhes conferem maior sensibilidade na detecção de diversos mutágenos, tais como: a deleção do gene *uvrB*, que elimina o mecanismo de reparo de excisão, permitindo que mais lesões no DNA sejam reparadas pelo mecanismo suscetível ao erro (*error-prone*) quando o plasmídeo pKM101 está presente; e a mutação *rfa*, que causa a perda parcial da camada lipopolissacarídica (LPS) da parede bacteriana, tornando-a mais permeável para difusão de moléculas grandes que normalmente não penetram nas células (MORTELMANS, ZEIGER, 2000).

A linhagem TA98 tem como característica a mutação *hisD3052* no operon da histidina, que codifica para a enzima histidinol dehidrogenase, de forma a detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura. Mutágenos com essa 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 TA98 é derivada da TA1538 e apresentam o plasmídeo pKM101, que contém o gene *mucAB* aumentando a mutagenicidade espontânea e induzida, pois eleva o sistema de reparo no DNA suscetível ao erro, denominado *error-prone* (MARON, AMES, 1983).

A linhagem YG1041 foi construída em 1993 por Hagiwara et al., e é derivada da linhagem TA98 com o diferencial da adição de um novo plasmídeo (pYG233) que 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 *Salmonella typhimurium* (WATANABE et al., 1989), enquanto a acetiltransferase (AT) é uma

enzima chave para a ativação intracelular de nitroarenos e aminas aromáticas (WATANABE et al., 1990). Os nitroarenos e aminas aromáticas são compostos químicos distribuídos no ambiente, de potencial mutagênico e carcinogênico reconhecidos. Esse grupo de nitrocompostos é metabolicamente ativado à arilhidroxilaminas através da redução de seu grupo funcional, pela ação das nitroreduases. As arilhidroxilaminas resultantes são então esterificadas pela acetil-CoA: N-hidroxiarilamina-O-acetiltransferase, a qual está presente também na célula bacteriana (WATANABE et al., 1989; 1990). Dessa forma, a linhagem YG1041 de *S. typhimurium* com superprodução das enzimas é mais sensível na detecção desses compostos.

A linhagem TA1538 é parental da TA98 e também possui a mutação *hisD3052*. Assim, apresenta como ponto referencial para reversão de oito resíduos repetitivos de CG e com capacidade de detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura. A diferença em relação a TA98 é que ela não contém o plasmídeo pKM101, portanto, o sistema de reparo tipo *error prone* não é facilitado (AMES et al., 1973a; 1973b).

A linhagem YG5161 foi construída a partir da TA1538 e tem as mesmas características que a sua parental, como a mutação *hisD3052* no operon da histidina, mutação *rfa* e deleção do gene *uvrB* e *bio*, com o diferencial da adição do plasmídeo (pYG768) carregando o gene *dinB*, que codifica para o DNA Polimerase IV, cuja superprodução está relacionada a um aumento da mutagenicidade de alguns compostos (ex: HPA) devido ao seu envolvimento com a resposta SOS (MATSUI et al., 2006). Matsui et al. (2006) sugere a utilização da YG5161 como uma linhagem mais sensível na detecção de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos não substituídos, como, por exemplo, o benzo[a]pireno, mas nesse caso a ativação metabólica exógena é necessária para formação de adutos de DNA, sendo preciso a utilização de S9 para detecção no ensaio Salmonella/microsossoma. A Tabela 2 resume as características de algumas das linhagens utilizadas no ensaio.

Tabela 2 - Características genéticas das linhagens de *Salmonella typhimurium* empregadas nesse trabalho

<b>Linhagem</b>	<b>Descrição</b>	<b>Tipo de mutação</b>	<b>Plasmídeo</b>	<b>Referências</b>
YG1041	<i>hisD3052</i> , $\Delta$ ( <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ), <i>rfa</i> , superprodução de NR e O-AT, Ap <sup>r</sup> e Km <sup>r</sup>	Deslocamento do quadro de leitura	pKM101, pYG216	Azuma et al., (1997)
TA98	<i>hisD3052</i> , $\Delta$ ( <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ), <i>rfa</i> , Ap <sup>r</sup>	Deslocamento do quadro de leitura	pKM101	Maron e Ames, (1983)
YG5161	<i>hisD3052</i> , $\Delta$ ( <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ), <i>rfa</i>	Deslocamento do quadro de leitura	pYG768	Matsui et al., (2006)
TA1538	<i>hisD3052</i> , $\Delta$ ( <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ), <i>rfa</i>	Deslocamento do quadro de leitura	-	Maron e Ames, (1983)

*his* – mutação responsável pela síntese da histidina

$\Delta$ *uvrB* – deleção do gene *uvrB*

$\Delta$ *bio* – deleção do gene da biotina

*rfa* – mutação que causa perda parcial da camada lipopolissacarídica

Ap<sup>r</sup> – resistente à ampicilina

NR – nitroreduases

O-AT – O-acetiltransferases

Km<sup>r</sup> – resistente a kanamicina

### **3 OBJETIVO**

Este trabalho objetiva estudar a mutagenicidade de distintas frações de extratos orgânicos de material particulado de ar, utilizando o ensaio Salmonella/microsossoma em microssuspensão com os pares de linhagens YG1041/TA98, TA98/TA1538 e YG5161/TA1538 de *Salmonella typhimurium*, que apresentam diferentes sensibilidades para tipos específicos de compostos. Também foi objetivo do trabalho comparar as potências mutagênicas obtidas para cada uma das frações com os níveis de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos analisados.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em cooperação com a professora Dra. Lilian Rothschild e a Me. Kely F. Souza do Instituto de Química da USP. As coletas foram realizadas pelos grupos de pesquisa participantes de um amplo projeto temático financiado pela FAPESP - *Effects of emissions on current and future rainfall patterns in southeast Brazil*, processo 08/58073-5. A extração, o fracionamento e a caracterização química foram realizados pela aluna de doutorado Kely F. Souza, sendo parte da sua tese “Influência da queima da cana-de-açúcar nos níveis de HPA, nitro-HPA e oxi-HPA associados ao aerossol atmosférico” em preparação.

### 4.1 Área de estudo e coleta de amostras

O estudo foi realizado no município de Araraquara, localizado no centro do Estado de São Paulo. A cidade conta com uma população estimada em 208 mil habitantes, o clima é caracterizado como tropical de altitude (IBGE, 2012), e a estrutura industrial do município está baseada na agroindústria, representada pelo binômio de cana e laranja (Prefeitura Municipal de Araraquara, 2012).

A cidade de Araraquara é uma região afetada pelas queimadas de palha de cana-de-açúcar e com intenso tráfego de veículos leves e pesados, já que duas rodovias importantes - SP-255 (norte/sul) e SP-310 (leste/oeste) - cortam o município (Prefeitura Municipal de Araraquara, 2012). As coletas de material particulado foram realizadas pelo grupo do projeto temático dentro do campus da Faculdade de Ciências e Letras da Unesp de Araraquara

O equipamento utilizado para coleta das amostras de partículas totais em suspensão - PTS – foi o amostrador de grande volume AGV-PTS (ENERGÉTICA®), ilustrado na Figura 2. Nesse equipamento, as partículas aspiradas do ar são filtradas por um filtro onde as partículas com diâmetro aerodinâmico entre 0,1 e 100  $\mu\text{m}$  são retidas.



Figura 2 - Amostrador de grande volume para partículas totais em suspensão.

Para a coleta foi utilizado um filtro de fibra de vidro (ENERGÉTICA) com dimensões de 254 x 233 mm e poros com 0,33  $\mu\text{m}$  de diâmetro. O filtro foi colocado sobre a tela de alumínio no amostrador e, em seguida, o equipamento foi programado para a coleta. Depois de encerrado o período de medição, o filtro foi retirado e levado ao laboratório.

## 4.2 Preparo da amostra

Foram realizadas nove coletas com duração de 16 h. No processo de fracionamento, o volume de cada fração é o volume equivalente em  $\text{m}^3$  de cada coleta. Para o ensaio de Salmonella/microsoma, foi utilizada, como valor para o preparo das doses, a somatória do volume de cada coleta, sendo de 688,72  $\text{m}^3$  para cada fração.

#### **4.2.1 Procedimento de extração orgânica**

Para extração foi utilizado  $\frac{1}{4}$  de cada filtro. O filtro foi submetido à extração por Soxhlet, com 200 mL de diclorometano 99,9 %, durante um período de 24 h. Os extratos foram evaporados até os volumes de 100 ou 50  $\mu$ L.

#### **4.2.2 Fracionamento dos extratos orgânicos e análises químicas**

Os extratos concentrados foram fracionados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase normal e um detector UV. Para o fracionamento utilizou-se eluição por gradiente, começando com 100% de n-hexano (Mallinckrodt 95%) e aumentando a porcentagem de diclorometano gradualmente até 100% deste solvente.

Três frações foram coletadas, conforme o aumento da polaridade da fase móvel. Na primeira, espera-se encontrar os compostos pouco polares, os HPA. Já na segunda fração, espera-se encontrar o grupo do Nitro-HPA e na terceira, os Oxi-HPA, compostos de maior polaridade.

Para os ensaios de mutagenicidade foram examinadas as frações HPA, Nitro-HPA e Oxi-HPA. Para poder analisar a mutagenicidade, as coletas foram combinadas em único extrato de cada fração. As frações de HPA, Nitro-HPA e Oxi-HPA foram analisadas utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a um detector de espectrometria de massa e uma biblioteca NIST. As Tabelas 3, 4 e 5 apresentam as concentrações em  $\text{ng.m}^{-3}$  dos compostos estudados nas frações HPA, Nitro-HPA e Oxi-HPA.

Tabela 3 - Concentração dos compostos identificados na fração HPA. (Fonte: Souza, K.F.; comunicação pessoal).

<b>Compostos</b>	<b>Concentração ng.m<sup>-3</sup></b>
Naftaleno (Nap)	1,346
Acenaftileno (Acy)	3,142
Acenafteno (Ace)	0,37
Fluoreno (Flu)	0,526
Fenantreno (Phe)	4,268
Antraceno (Ant)	0,314
Fluoranteno (Fla)	19,494
Pireno (Pyr)	9,338
Benzo[a]antraceno (BaA)	14,069
Criseno (Chr)	6,2
Benzo[b]fluoranteno (BbF)	25,134
Benzo[a]pireno (BaP)	3,346

Tabela 4 - Concentração dos compostos identificados na fração Nitro-HPA. (Fonte: Souza, K. F.; comunicação pessoal).

<b>Compostos</b>	<b>Concentração ng.m<sup>-3</sup></b>
1-Nitronaftaleno (1-NNap)	<LQ
2- Nitronaftaleno (2-NNap)	8,405
2-Nitrofluoreno (2-NFlu)	3,236
9-Nitroantraceno (9-NAnt)	4,162
9-Nitrofenantreno (9-NPhe)	20,707
2-Nitrofluoranteno (2-NFla)	9,439
3-Nitrofluoranteno (3-NFla)	0,928
1-Nitropireno (1-NPyr)	<LQ
2-Nitropireno (2-NPyr)	1,455
7-Nitrobenzo(a)antraceno (7-NBaA)	5,141
6-Nitrocriseno (6-NChr)	<LQ

LQ – Limite de quantificação

Tabela 5 - Concentração dos compostos identificados na fração Oxi-HPA. (Fonte: Souza, K. F.; comunicação pessoal).

<b>Compostos</b>	<b>Concentração ng.m<sup>-3</sup></b>
9-Fluorenona (9-Flu)	4,638
9,10-Antraquinona (9,10-Ant)	13,435
1,9-Benzo[10]antrona (Bzo)	15,632

### **4.3 Ensaio Salmonella/microssoma**

Os ensaios de mutagenicidade foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental Prof. Dr. Abílio Lopes (LEAL) pelo autor deste trabalho. As frações foram transferidas para frascos esterilizados e levadas do laboratório da USP para Limeira, protegidas da luz e em caixa de isopor com blocos de gelo. Elas foram totalmente secas em nitrogênio gasoso ultrapuro e ressuspensas em dimetilsulfóxido (DMSO), grau espectrométrico em concentrações adequadas para o teste.

#### **4.3.1 Preparo das soluções e meio de cultura**

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). O ensaio foi conduzido em condições de esterilidade. As características genéticas de todas as linhagens utilizadas foram avaliadas para garantia da qualidade e confiabilidade dos resultados.

Todo material utilizado que teve contato com a bactéria foi descontaminado para depois ser descartado ou lavado. O preparo de material, lavagem de vidraria, descontaminação e descarte do material utilizado seguiu as normas vigentes de qualidade do Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental Prof. Dr. Abílio Lopes (LEAL).

### 4.3.2 Crescimento das culturas

Na véspera do dia do ensaio para cada experimento, 0,1 mL da linhagem utilizada no teste foi inoculada em um frasco contendo 20 mL de caldo nutriente a partir do estoque e colocada a 37 °C pelo período de 12-16 horas *overnight* com agitação de 150-170 rpm (rotação por minuto) em uma mesa agitadora tipo *shaker* (TECNAL mod. TE420), para crescimento até a densidade de  $1-2 \times 10^9$  unidades formadoras de colônias por mL.

### 4.3.3 Protocolo do método em micro suspensão

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

O ensaio de mutagenicidade Salmonella/microsoma consistiu na exposição da linhagem a amostra testada em placa de ágar mínimo na ausência ou presença de ativação metabólica (mistura S9). No dia seguinte, a cultura bacteriana foi transferida para frascos graduados estéreis de plástico com volume de 50 mL e centrifugados a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C em centrífuga refrigerada (EPPENDORF mod. 5804R). Após o procedimento de centrifugação, foi descartado com cuidado o sobrenadante e, em seguida, a cultura foi ressuspensa em 4 mL de solução 1:13 v/v de tampão fosfato 0,2 M, e agitada com cuidado. As culturas foram mantidas refrigeradas até o momento de serem utilizadas.

As diferentes doses foram preparadas a partir da diluição do extrato (item 4.2.2) em DMSO, de forma a se obter as doses de: 0,02; 0,2; 1; 2; 5 e 10  $\mu\text{g}$  por placa. Todos os ensaios foram realizados em ausência e presença de ativação metabólica através do uso da fração S9, induzida com Aroclor 1254 (Moltox, USA).

Em tubos de ensaio estéreis devidamente identificados, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de amostra, 50  $\mu\text{L}$  da suspensão da cultura bacteriana e 50  $\mu\text{L}$  da solução tampão fosfato 0,2 M 1:13 v/v, para o ensaio sem ativação metabólica. Para os ensaios com ativação metabólica, ao invés da

solução tampão, adicionou-se 50 µL da mistura S9. Depois de adicionados todos os componentes, os tubos foram homogeneizados e incubados a 37 °C por 90 minutos em mesa agitadora tipo *shaker* (TECNAL mod. TE420) sem agitação. Após esse tempo, foram adicionados 2 mL de ágar de superfície (suplementado com biotina/histidina), homogeneizados e vertidos em placas de ágar mínimo. As placas foram incubadas invertidas, por 66 horas em temperatura de 37 °C em uma estufa bacteriológica (MARCONI mod. MA032). A Figura 3 ilustra o ensaio de Salmonella/microsoma segundo o protocolo do método em microssuspensão. Os ensaios foram realizados utilizando duas placas por dose, incluindo em cada teste controles negativos e positivos.

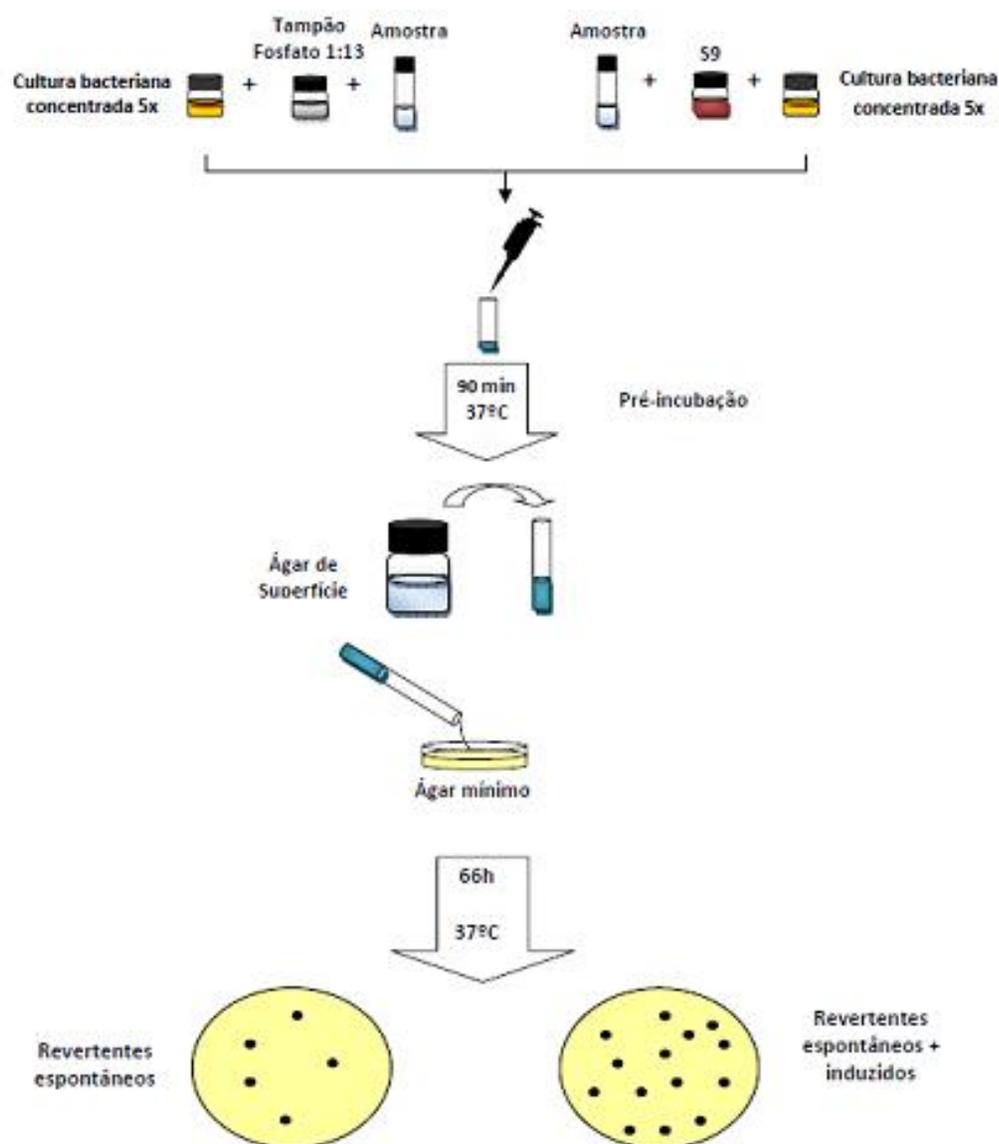


Figura 3 - Protocolo esquemático do teste Salmonella/microsossoma em microssuspensão. (ALVES, 2011).

#### 4.6.4 Controles positivos e negativos

O ensaio foi realizado sempre com controles negativos e positivos, de forma a assegurar a capacidade de resposta da linhagem e a eficácia do sistema de ativação metabólica. Como controle negativo, foi utilizado o solvente DMSO. O controle negativo é necessário para

estabelecer o número de revertentes espontâneos. Como controles positivos, foram utilizados compostos mutagênicos específicos para cada linhagem em concentrações definidas. A Tabela 6 indica os controles positivos utilizados para cada linhagem para os ensaios com e sem ativação metabólica.

Tabela 6 - Controle positivo utilizado para cada linhagem de *Salmonella typhimurium* utilizada neste trabalho.

<b>Linhagem</b>		<b>Controle Positivo</b>	<b>Dose (<math>\mu\text{g.placa}^{-1}</math>)</b>
YG1041	- S9	4-nitro-o-diamino-fenilina (4NOP)	2,5
	+ S9	2-aminoantraceno (2AA)	0,03125
TA98	- S9	4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO)	0,125
	+ S9	2-aminoantraceno (2AA)	0,625
YG5161	- S9	4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO)	0,125
	+ S9	2-aminoantraceno (2AA)	0,625
TA1538	- S9	4-nitro-o-diamino-fenilina (4NOP)	2,5
	+ S9	2-aminoantraceno (2AA)	0,625

## 4.7 Interpretação de resultados

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 a relação dose-resposta comprovada estatisticamente, indicam a atividade genotóxica da amostra.

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.

#### **4.8 Critérios de avaliação e expressão de resultados**

Uma amostra foi considerada positiva quando apresentou, em pelo menos uma das linhagens empregadas, relação dose-resposta estatisticamente significativa entre as concentrações testadas e os valores de revertentes espontâneos. Os resultados foram expressos em revertentes por m<sup>3</sup>.

Para a comparação dos resultados de mutagenicidade observados nas frações com dados apresentados na literatura, foi construído um gráfico, adaptado de Alves (2011). Os gráficos foram construídos a partir da razão entre as potências mutagênicas 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.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.3 Resultados de mutagenicidade**

As frações Nitro-HPA, Oxi-HPA e HPA foram avaliadas com o teste Salmonella/microsossoma pelo método de microssuspensão com e sem ativação metabólica exógena (S9) (KADO et al., 1983). Foram utilizadas as linhagens TA98, YG1041, TA1538 e YG5161. Dados da literatura foram utilizados para avaliar a contribuição na mutagenicidade dos compostos identificados nas Tabelas 3, 4 e 5, para cada fração.

Os resultados de mutagenicidade foram avaliados junto com o perfil de mutagenicidade observado em compostos químicos puros pesquisados na literatura, para a comparação foi utilizado à razão entre as potências obtidas para as linhagens em pares YG1041/TA98, TA98/TA1538 e YG5161/TA1538, e assim avaliar quais são os prováveis contribuintes para mutagenicidade observada nas frações.

#### **5.3.1 Fração Nitro-HPA**

Na fração Nitro-HPA, espera-se encontrar os derivados nitrados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, presentes no material particulado atmosférico proveniente da queima de combustíveis fósseis, biomassa ou de reações dos HPA com gases atmosféricos (FRANCO, 2006; UMBUZEIRO et al 2008a, 2008b). A fração Nitro-HPA foi avaliada com as linhagens TA98, YG1041 e TA1538. A Tabela 7 apresenta a potência mutagênica dessa fração, que teve uma resposta mais alta sem adição de S9 para as três linhagens.

Tabela 7 - Potência mutagênica (revertentes.m<sup>-3</sup>) da fração Nitro-HPA com as linhagens TA98, YG1041 e TA1538 na ausência e presença de ativação metabólica (S9).

<b>Fração Nitro-HPA</b>		
<b>Linhagem</b>	<b>Sem S9</b>	<b>Com S9</b>
TA98	5,6	0,1
YG1041	680	70
TA1538	25	4

A fração Nitro-HPA foi capaz de induzir uma resposta positiva para ambas linhagens, com resposta aumentada para a YG1041, indicando a presença de compostos que são ativados pelas enzimas nitroredutases (NR) e *O*-acetiltransferases (OAT). Um decréscimo na mutagenicidade foi observado quando adicionado S9. Nitrocompostos, como, por exemplo, o 1-nitropireno, tem sua mutagenicidade reduzida quando o S9 é adicionado, o mesmo tipo de resposta observada para essa fração (CLAXTON et al., 2004; UMBUZEIRO et al., 2008a, 2008b).

Na tentativa de verificar a contribuição dos compostos alvos, identificados e quantificados na Tabela 4, dados das potências mutagênicas obtidos na literatura foram utilizados. A Tabela 8 apresenta a contribuição em porcentagem dos compostos identificados na fração Nitro-HPA para as linhagens TA98, TA1538 e YG1041, segundo dados da literatura (HAGIWARA et al.,1993 e MATSUI et al., 2006). Para a linhagem YG1041, só foi encontrado dado para o 2-Nitrofluoreno. A comparação foi feita somente em ausência de ativação metabólica (S9).

Tabela 8 - Contribuição dos compostos químicos, em porcentagem, na mutagenicidade da fração Nitro-HPA na ausência de S9.

	2- Nitronaftaleno (2-NNap)		3-Nitrofluoranteno (3-NFla)		2-Nitrofluoreno (2-NFlu)		
Linagem	TA98	TA1538	TA98	TA1538	TA98	TA1538	YG1041
Concentração ug.m <sup>-3</sup>	8,405x10 <sup>-3</sup>		9,28x10 <sup>-4</sup>		3,236x10 <sup>-3</sup>		
Potência mutagênica (rever.ug <sup>-1</sup> ) na literatura do composto	2,9	1,3	22020	5207	219	141	248260
Contribuição da mutagenicidade (rever.m <sup>-3</sup> ) na fração causado pelo composto	0,02	0,01	20,4	4,83	0,70	0,46	803
Potência mutagênica (rever.m <sup>-3</sup> ) da fração	5,6	25	5,6	25	5,6	25	680
Contribuição em porcentagem na mutagenicidade da fração causado pelo composto	0,40%	0,01%	>100%	19%	12,5%	1,84%	>100%

Avaliando a contribuição em porcentagem, a mutagenicidade observada na TA98 pode ser explicada pelo 3-NFla e na YG1041, pelo 2-NFlu, mas nenhum dos 3 compostos explica totalmente a mutagenicidade observada na TA1538, o que pode indicar a presença de outros compostos, identificados (Tabela 4) ou não, responsáveis pela resposta positiva para essa linhagem.

### 5.3.2 Fração Oxi-HPA

Na fração Oxi-HPA, espera-se encontrar os derivados oxigenados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, presentes no material particulado atmosférico proveniente da queima de combustíveis fósseis, biomassa ou de reações dos HPA com gases atmosféricos (FRANCO, 2006; UMBUZEIRO et al 2008a, 2008b). A fração Oxi-HPA foi avaliada com as linhagens TA98, YG1041 e TA1538, Tabela 9. Ela apresentou elevada mutagenicidade para YG1041 em comparação com as outras, em ausência de ativação metabólica exógena (S9).

Tabela 9 - Comparação da potência mutagênica (revertentes.m<sup>-3</sup>) da fração Oxi-HPA entre as linhagens TA98, YG1041 e TA1538 na ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Fração Oxi-HPA		
Linhagem	Sem S9	Com S9
TA98	53	2,2
YG1041	2600	200
TA1538	47	9

A fração Oxi-HPA apresentou elevada atividade mutagênica em ausência de S9, com decréscimo da resposta quando S9 é utilizado. Essa resposta elevada para YG1041 indica que os

compostos presentes são preferencialmente metabolizados pelas enzimas NR e OAT, que são super-expressas na YG1041.

Segundo Hagiwara et al. (1993), as respostas observadas sugerem a presença de compostos como 2-Nitrofluoreno (2-NF), 2,6-Dinitrotolueno (2,6-DNT), 1-Nitropireno (1-NP), 1,8-Dinitropireno (1,8-DNP), 2 aminofluoreno, entre outros. Nos trabalhos utilizados como referência, não foram encontrados os compostos identificados (Tabela 5) na fração Oxi-HPA, para poder verificar a contribuição na mutagenicidade observada.

As respostas observadas comportaram-se como as substâncias sugeridas por Hagiwara (1993), o que pode indicar que outros compostos não identificados (Tabela 5) podem estar presentes na fração e abaixo do limite de detecção, já que alguns Oxi-HPA, como o 3-nitrobenzantrona, é altamente mutagênico para a linhagem YG1041, podendo produzir uma resposta positiva no ensaio Salmonella/microsoma em pg (ENYA et al., 1997).

### **5.3.3 Fração HPA**

A fração HPA foi testada com as linhagens TA98, TA1538 e YG5161. Esta última mostrou-se mais sensível para HPA não substituídos do que as usualmente utilizadas no ensaio Salmonella/microsoma (MATSUI et al., 2006). Com base na Tabela 10, é possível observar uma resposta positiva quando utilizada ativação metabólica para as linhagens TA1538 e YG5161, o que indica que os compostos presentes necessitam de ativação metabólica para serem capazes de induzir uma resposta positiva.

Tabela 10 - Comparação da potência mutagênica (revertentes.m<sup>-3</sup>) da fração HPA entre as linhagens TA98, TA1538 e YG5161 na ausência e presença de ativação metabólica (S9).

<b>Fração HPA</b>		
<b>Linhagem</b>	<b>Sem S9</b>	<b>Com S9</b>
TA98	1,5	0,6
TA1538	1,4	3,5
YG5161	2,4	5,5

A Tabela 11 apresenta a contribuição em porcentagem dos compostos identificados na mutagenicidade da fração HPA para as linhagens TA98, TA1538 e YG5161, segundo dados da literatura (MATSUI et al., 2006.).

Tabela 11 - Contribuição dos compostos químicos, em porcentagem, na mutagenicidade da fração HPA na ausência de S9.

Linhagem	Benzo[a]pireno (BaP)			Benzo[a]antraceno (BaA)		
	TA98	TA1538	YG5161	TA98	TA1538	YG5161
Concentração ug.m <sup>-3</sup>	3,346x10 <sup>-3</sup>			1,4069x10 <sup>-2</sup>		
Potência mutagênica (rever.ug <sup>-1</sup> ) na literatura do composto	30	15	104	10	1	2
Contribuição da mutagenicidade (rever.m <sup>-3</sup> ) na fração causado pelo composto	0,1	0,05	0,35	0,14	0,01	0,03
Potência mutagênica (rever.m <sup>-3</sup> ) da fração	0,6	3,5	5,5	0,6	3,5	5,5
Contribuição em porcentagem na mutagenicidade da fração causado pelo composto	17%	1,43%	6,40%	23%	0,30%	0,54%

Avaliando a contribuição das substâncias, é possível inferir que a mutagenicidade não é totalmente explicada pelos compostos identificados citados, o que pode indicar que outros compostos identificados (Tabela 3) ou não podem ser responsáveis pela mutagenicidade encontrada.

## 5.4 Comparação da mutagenicidade observada com dados da literatura

A comparação entre o perfil de mutagenicidade obtido com diferentes pares de linhagens das frações e o perfil da mutagenicidade de alguns grupos de compostos químicos pode indicar possíveis compostos que poderiam estar contribuindo para as respostas obtidas (Alves, 2011). As figuras a seguir apresentam a comparação da razão entre o número de revertentes de compostos químicos e as frações estudadas utilizando os pares YG1041/TA98, TA98/TA1538 e YG5161/TA1538.

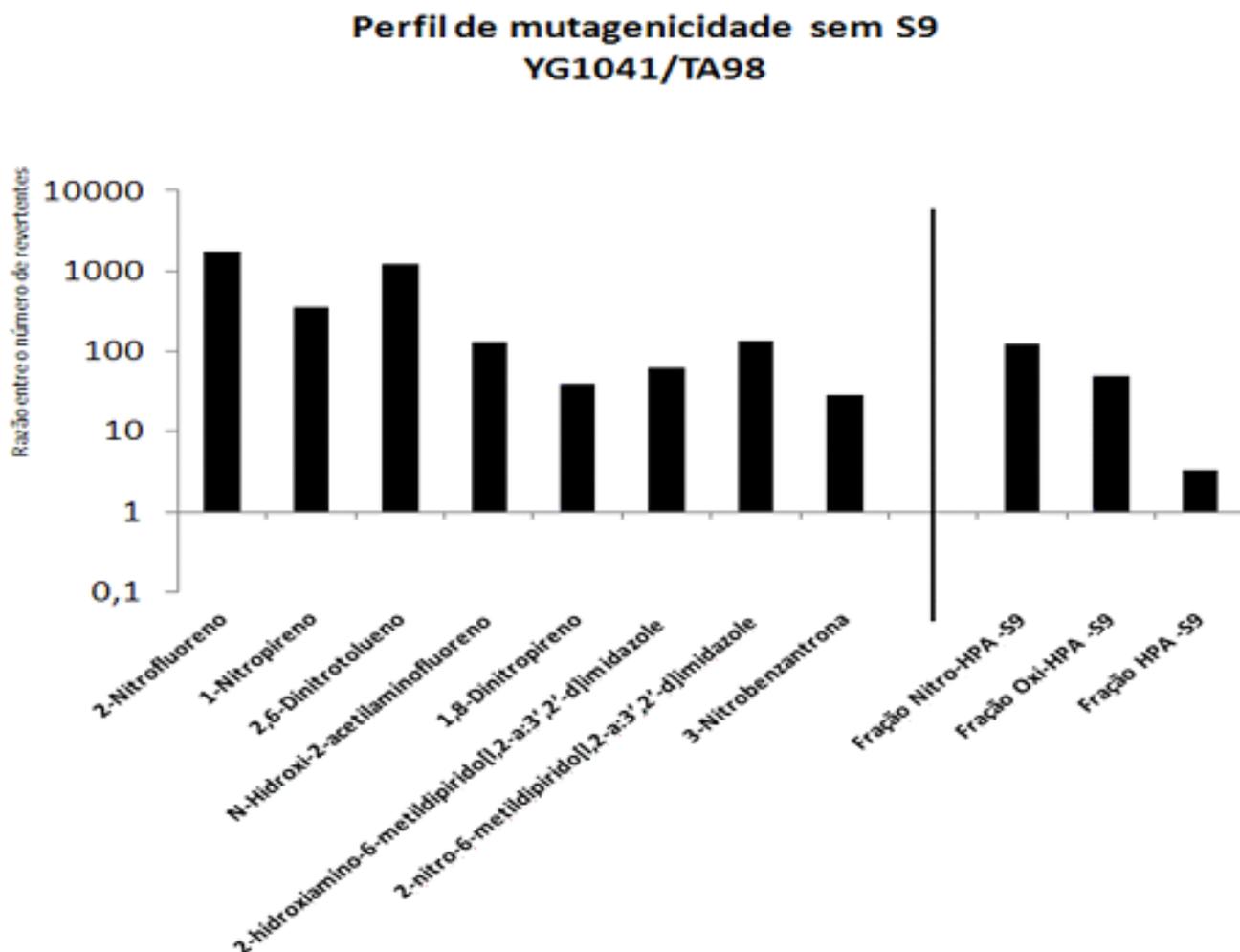


Figura 4 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as frações para o par de linhagens YG1041/TA98 na ausência de S9. Os dados foram apresentados em escala logarítmica. Fonte: Hagiwara et al., 1993. Adaptado: Alves, 2011.

Analisando o perfil da mutagenicidade de compostos químicos com as linhagens YG1041/TA98 (HAGIWARA et al., 1993), em ausência de ativação metabólica (S9), é possível inferir que qualquer um dos compostos podem estar presentes nas frações. Os seguintes compostos foram destacados, pois apresentam uma resposta parecida com a obtida, para a fração Nitro-HPA os compostos N-Hidroxi-2-acetilaminofluoreno e o 2-nitro-6-metildipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazole, e para a fração Oxi-HPA 1,8 Dinitropireno e 2-hidroxiamino-6-metildipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazole.

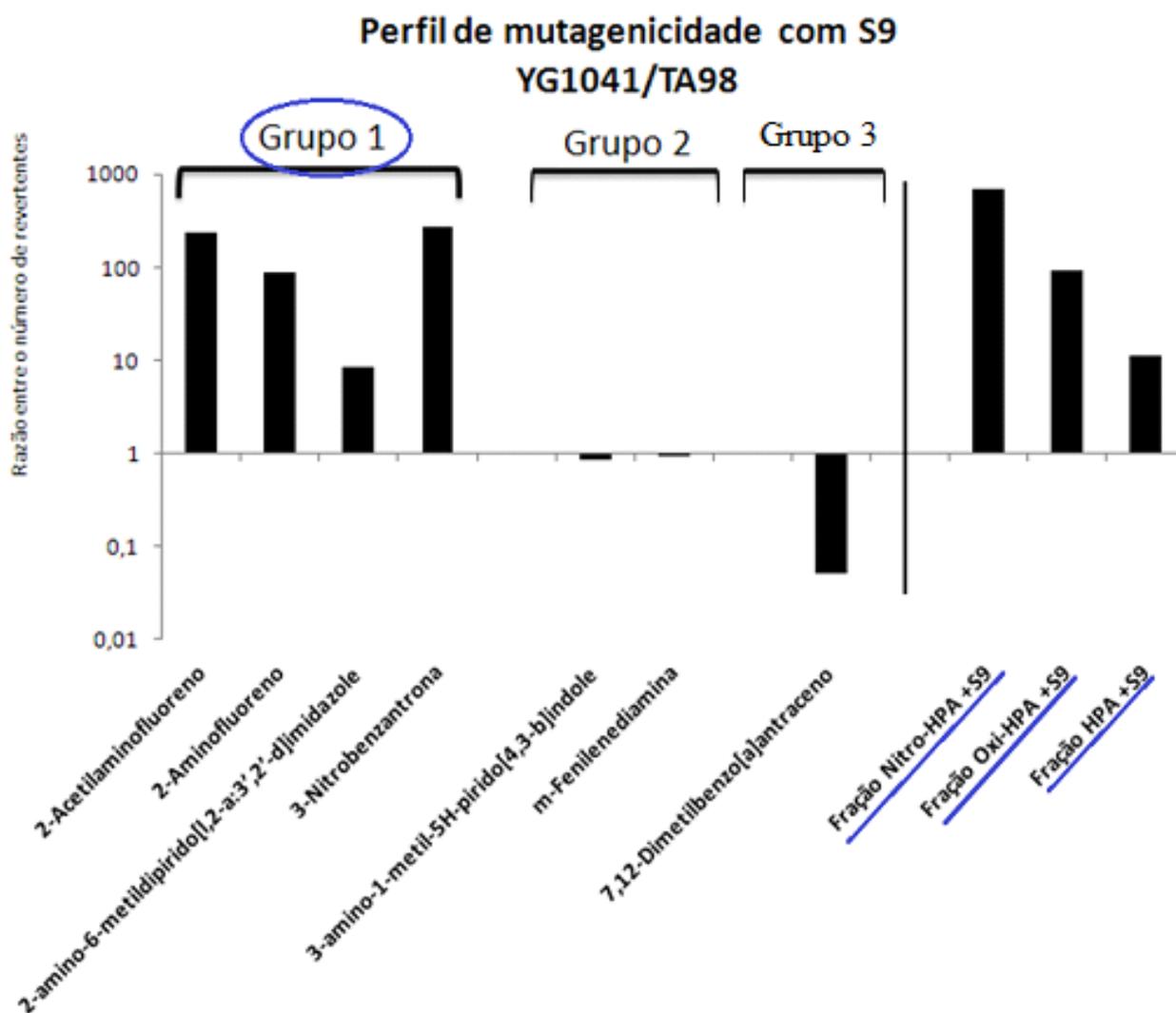


Figura 5 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as frações para o par de linhagens YG1041/TA98 na presença de S9. Os dados foram apresentados em escala logarítmica. Fonte: Hagiwara et al., 1993. Adaptado: Alves, 2011.

Nota: — Resposta semelhante.

Para o perfil mutagênico apresentado com ativação metabólica para o par YG1041/TA98, três grupos podem ser observados para os compostos estudados por Hagiwara et al. (1993), o grupo 1 possui compostos que tem sua mutagenicidade aumentada com YG1041 em relação a TA98, o grupo 2 compostos que possuem mutagenicidade semelhante para as duas linhagens e o grupo 3 representado por apenas um composto, possui mutagenicidade maior para TA98.

Com o par YG1041/TA98, o perfil em presença de ativação metabólica (S9), demonstra que ambas as frações apresentaram a mutagenicidade aumentada para YG1041, indicando que as substâncias do grupo 1 é o que melhor explica os resultados obtidos.

Perfil de mutagenicidade sem S9  
TA98/TA1538

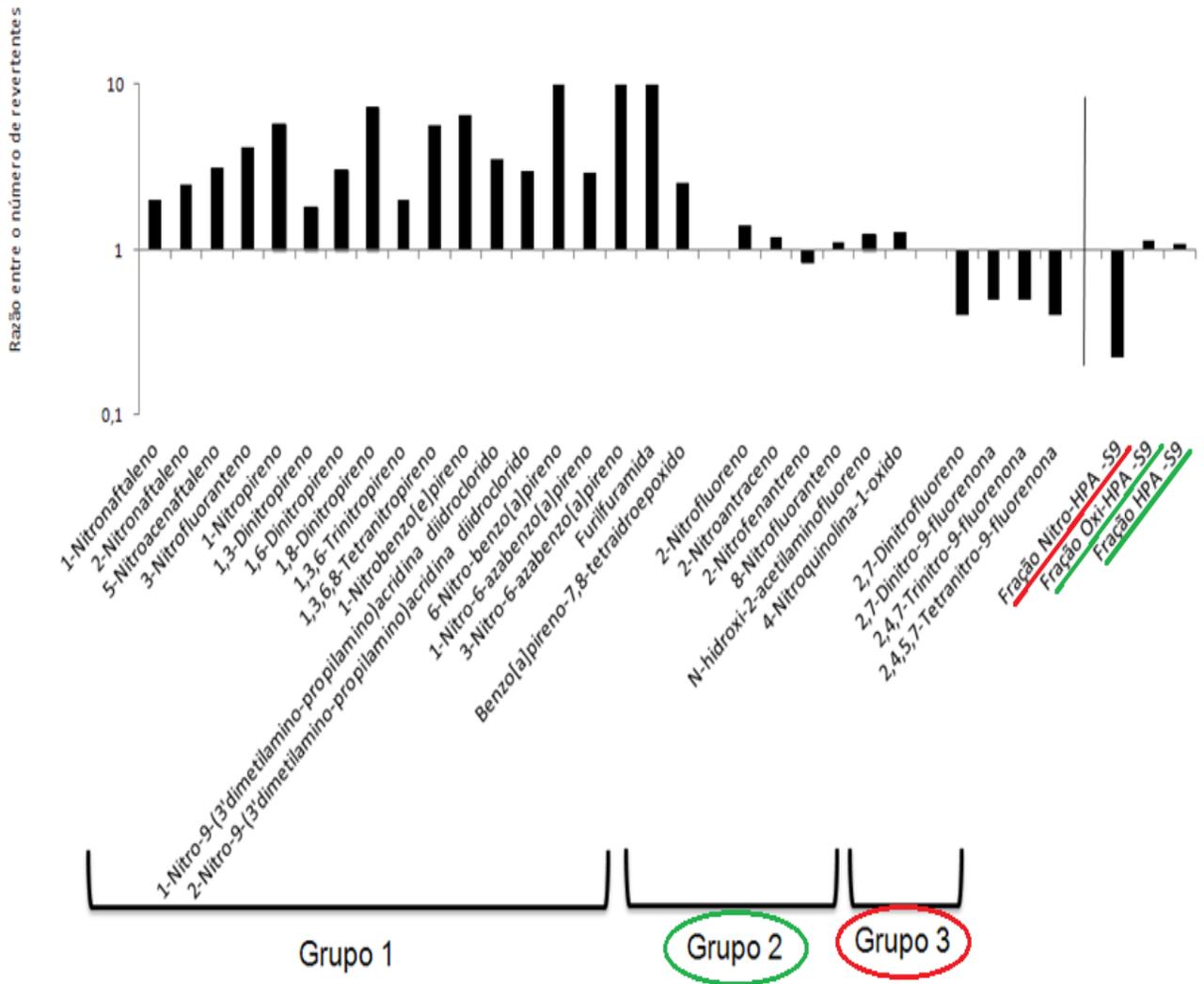


Figura 6 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as frações para o par de linhagens TA98/TA1538 na ausência de S9. Os dados foram apresentados em escala logarítmica. Fonte: Rosenkranz; Mermelstein, 1983. Adaptado: Alves, 2011.

Nota: █ Resposta semelhante.

Para o perfil com o par TA98/TA1538, é possível observar três grupos, para os compostos estudados por Rosenkranz e Mermelstein (1983), grupo 1 com compostos que

apresentaram maior mutagenicidade para a TA98, grupo 2 com resposta semelhante para ambas linhagens e o grupo 3 com um resposta mais elevada para a TA1538.

A análise do perfil de compostos químicos com as linhagens TA98/TA1538, em ausência de ativação metabólica (S9), indica que para a fração Nitro-HPA, os compostos que poderiam justificar a resposta observada pertencem ao grupo 3. Para as frações Oxi-HPA e HPA, o grupo 2 é o que melhor explica o perfil observado. Não há dados de mutagenicidade com compostos químicos e essas linhagens na presença de S9.

## Perfil de mutagenicidade sem S9 YG5161/TA1538

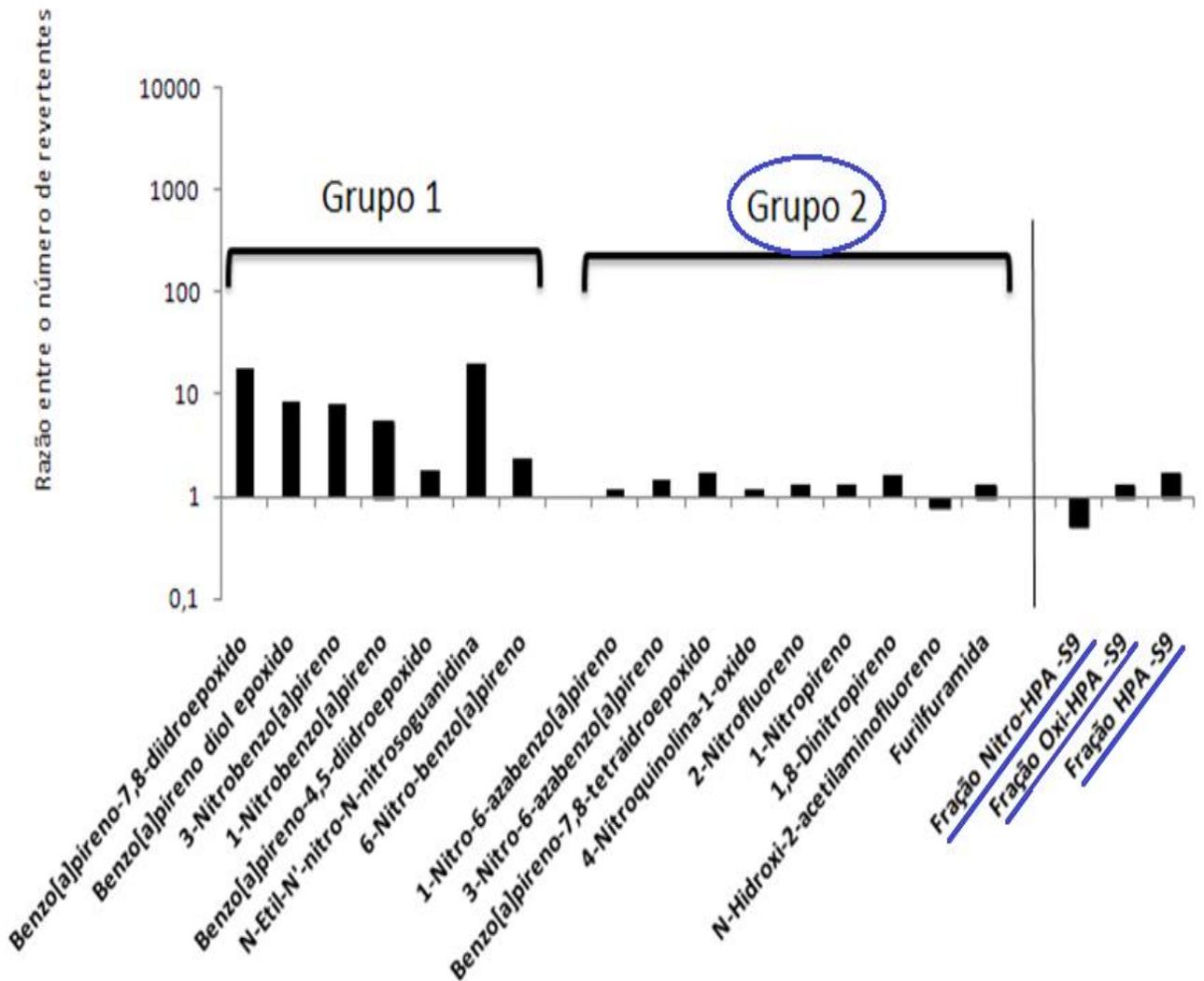


Figura 7 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as frações para o par de linhagens YG5161/TA1538 na ausência de S9. Os dados foram apresentados em escala logarítmica. Fonte: Matsui et al., 2006. Adaptado: Alves, 2011.

Nota: — Resposta semelhante.

Para o par YG5161/TA1538 sem ativação metabólica é possível observar dois grupos, para os compostos estudados por Matsui et al. (2006), o grupo 1 que possui substâncias que

apresentaram resposta maior para a YG5161 em relação a TA1538, e o grupo 2 com respostas semelhantes para as duas linhagens.

Examinando o perfil com as linhagens YG5161/TA1538, em ausência de ativação metabólica (S9), é possível inferir que para ambas as frações os compostos que poderiam explicar a resposta observada pertencem ao grupo 2, isto sugere que uma enzima, tal como a DNA-polimerase III pode ser a responsável por corrigir este tipo de dano.

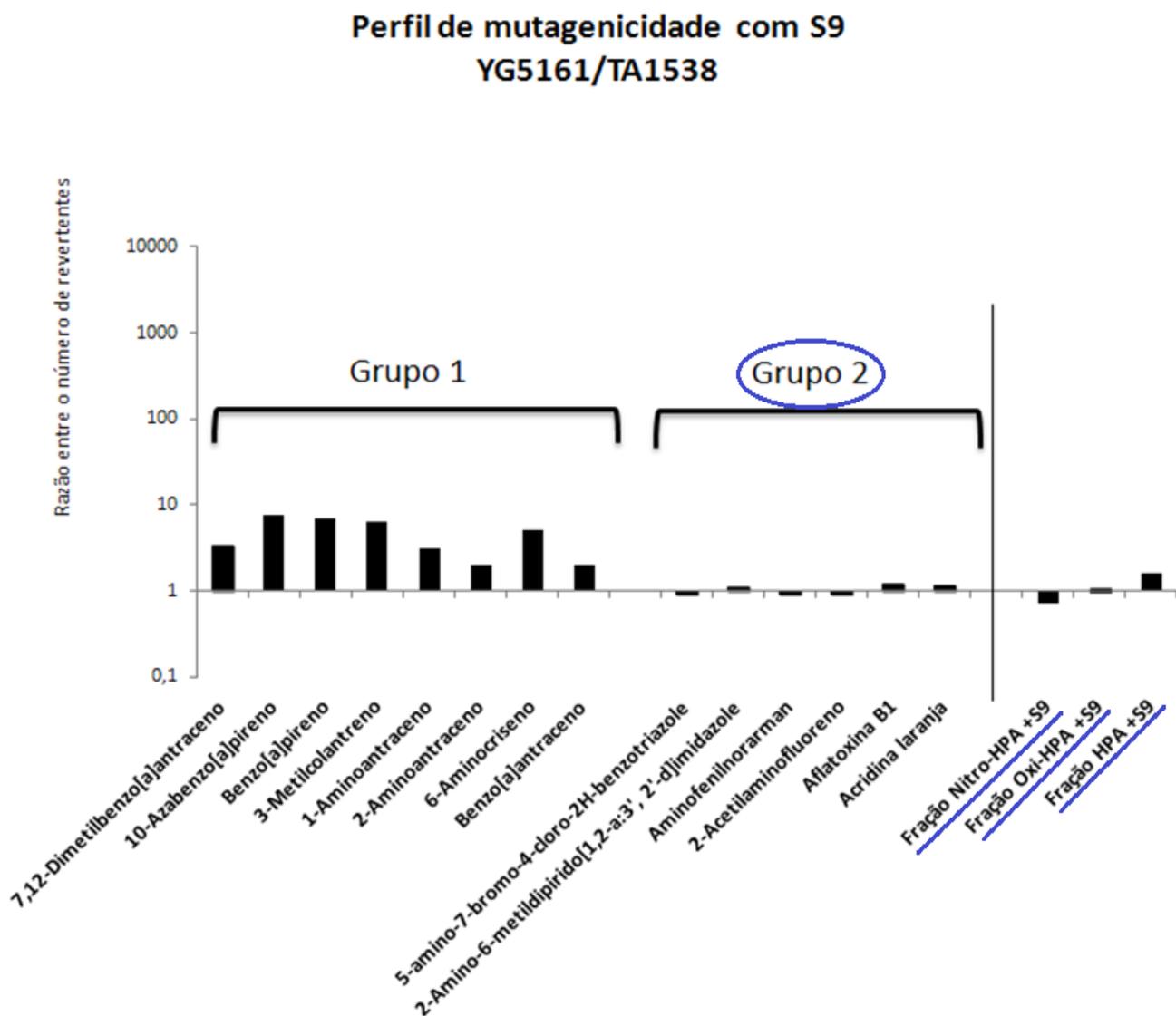


Figura 8 - Perfil de mutagenicidade de compostos puros em comparação com as frações para o par de linhagens YG5161/TA1538 na presença de S9. Os dados foram apresentados em escala logarítmica. Fonte: Matsui et al., 2006. Adaptado: Alves, 2011.  
Nota:        Resposta semelhante.

Para o par YG5161/TA1538 com ativação metabólica é possível observar dois grupos, para os compostos estudados por Matsui et al. (2006), o grupo 1 possui substâncias que apresentaram resposta maior para a YG5161 em comparação com a TA1538, e o grupo 2 com respostas semelhantes.

Analisando a mutagenicidade com o par YG5161/TA1538, em presença de ativação metabólica (S9), para as frações Nitro-HPA e Oxi-HPA, o grupo 2 é o que melhor explica a resposta observada; já para a fração HPA, o comportamento observado no grupo 1 é o que mais se assemelha.

Avaliando os perfis dos compostos químicos e das frações estudadas, utilizando os pares de linhagens YG1041/TA98, TA98/TA1538 e YG5161/TA1538, conclui-se que a mutagenicidade não é unicamente causada pelos compostos identificados, e que outros compostos estão presentes e produzindo uma resposta positiva.

## **6 CONCLUSÃO**

Ambas as frações, Nitro-HPA e Oxi-HPA, apresentaram respostas mutagênicas semelhantes, com maior mutagenicidade na ausência de ativação metabólica, quando comparadas com a resposta na presença para as linhagens TA98, YG1041 e TA1538. A fração HPA demonstrou maior mutagenicidade na presença de ativação metabólica, quando comparada com a resposta na ausência para as linhagens TA1538 e YG5161.

De acordo com a contribuição na mutagenicidade dos compostos identificados, foi possível inferir que esses não explicam totalmente a resposta observada para algumas linhagens, e que outros compostos podem estar causando esse efeito.

A comparação dos perfis mutagênicos entre as frações analisadas e os compostos químicos encontrados na literatura utilizando os pares de linhagens foi capaz de fornecer alguns grupos de compostos que podem justificar a mutagenicidade observada, porém, faltam dados e estudos com compostos químicos puros e as linhagens utilizadas em ausência e presença de ativação metabólica para uma avaliação plena.

## **7 RECOMENDAÇÃO**

Um estudo utilizando os pares de linhagens com compostos químicos pode ajudar a identificar e entender o perfil das respostas observadas em amostras ambientais de material particulado de ar bem como em outras amostras ambientais, especialmente em análises químicas direcionadas pelo efeito biológico (ADEB).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, D.K.M. **A aplicabilidade de combinações seletivas de linhagens *S. typhimurium* na caracterização da mutagenicidade de amostras de ar.** São Paulo, 2011. 153p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

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, 1973a.

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, 1973b.

AMES, B.N.; YAMASAKI, E. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria.. In: Hollander, A. (Ed.). **Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection.** Editora New York, Plenum Press, 1971, v. 1, chap.9, p. 267-282.

ASHBY, J.; TENNANT, R. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. **Mutation Research**, v.257, p.229-306, 1991.

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.

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.

CANEPARI, S.; ASTOLFI, M.L.; MORETTI, S.; CURINI, R. Comparison of extracting solutions for elemental fractionation in airborne particulate matter. **Talanta**, v.82, n.2, p.834-844, 2010.

Cetesb – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/ar/Informa??es-B?sicas/21-Poluentes>. Acesso: 25 de novembro de 2012.

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.; STEAD, A.G.; WALSH, D. An Analysis by chemical class *Salmonella* mutagenicity tests as precursors as animal carcinogenicity. **Mutation Research**, v.205, p.197-225, 1988.

CLAXTON, L.D.; UMBUZEIRO, G.A.; DEMARINI, D.M. The *Salmonella* mutagenicity assay: the stethoscope of genetic toxicology for the 21st Century. **Environmental Health Perspect**, v.118, p.1515-1522, 2010.

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.

CONCEIÇÃO, G.M.; MIRAGLIA, S.G.; KISHI, H.S.; SALDIVA, P.H.; SINGER, J.M. Air pollution and child mortality: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. **Environmental Health Perspect**, v.109(Suppl 3), p.347-350, 2001.

DAUMAS, R.P.; MENDONÇA, G.A.S.; LEON, A.P. Poluição do ar e mortalidade no Município do Rio de Janeiro: análise de série temporal. **Caderno de Saúde Pública**, v.20, p.311-319, 2004.

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.

Enya, T.; Suzuki, H.; Watanabe, T.; Hirayama, T.; Hisamatsu, Y. 3-Nitrobenzanthrone, a powerful bacterial mutagen and suspected human carcinogen found in diesel exhaust and airborne particulates. **Environ. Sci. Technol.** v. 31, p. 2772–2776, 1997.

FRANCO, A. **Nitro-HPA e Oxi-HPA no material particulado atmosférico: algumas contribuições para uma abordagem integrada**. São Paulo, 2006. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

GOOGLE MAPAS. Araraquara. Disponível em: <http://maps.google.com.br/maps?hl=pt-BR&tab=il>. Acesso em: 25 de novembro de 2012.

GOUVEIA, N.; BREMNER, S.A.; NOVAES, H.M. Association between ambient air pollution and birth weight in São Paulo, Brazil. **J. Epidemiol Community Health**, v.58, p.11-17, 2004.

GOUVEIA, N.; FREITAS, C.V.; MARTINS, L.C.; MARCILIO, I.O. Hospitalizações por causas respiratórias e cardiovasculares associadas a contaminação atmosférica no Município de São Paulo, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.22, n.12, p.2669-2677, 2006.

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, p.171-180, 1993.

HANNIGAN, M.P.; CASS, G.R.; PENMAN, B.W.; CRESPI, C.L.; LAFLEUR, A.L.; BUSBY Jr., W.F.; THILLY, W.G.; SIMONEIT, B.R.T. Bioassay-directed chemical analysis of Los Angeles airborne particulate matter using a human cell mutagenicity assay, **Environ. Sci. Technol.** v.32, p.3502-3514, 1998.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidade de Araraquara. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acesso: 25 de novembro de 2012.

KADO, N.Y.; LANGLEY, D.; EISENSTADT, E. A simple modification of the Salmonella liquid-incubation assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v.121, p.25-32, 1983.

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.; RECH, C.M.; COIMBRÃO, C.A.; ROUBICEK, D.A.; UMBUZEIRO, G.A. Comparison of the mutagenic activity of XAD4 and blue rayon extracts of surface water and related drinking water samples. **Mutation Research**, v.541, p.103-113, 2003.

LADEN, F.; NEAS, L.M.; DOCKERY, D.W.; SCHWARTZ, J. Association of fine particulate matter from different sources with daily mortality in six U.S. cities. **Environmental Health Perspectives**, v.108, p.941-947, 2000.

MALLING, H.; FRANTZ, C.N. In vitro versus in vivo metabolic activation os mutagens. **Environmental Health Perspectives**, v.6, p.71-82, 1973.

MARON, D.M; AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**, Amsterdam, v.113, p.173-214, 1983.

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.

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.

McCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B.N. Detection os carcinogens in the Salmonella/microsome test. Assay os 300 chemicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v.72, p.5135-5139, 1975.

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 Araraquara. Disponível em <http://www.araraquara.sp.gov.br/Pagina/Default.aspx?IDPagina=2995>. Acesso: 25 de novembro de 2012.

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.

RITZ, B.; YU, F.; FRUIN, S.; CHAPA, G.; SHAW, G.M.; HARRIS, J.A. Ambient air pollution and risk of birth defects in Southern California. **Am. J. Epidemiol**, v.155, p.17-25, 2002.

Souza, K.F. **Influência da queima da cana-de-açúcar nos níveis de HPA, nitro-HPA e oxi-HPA associados ao aerossol atmosférico**. São Paulo. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo. (Comunicação pessoal).

SQUADRITO, G.L.; CUETO, R.; DELLINGER, B.; PRYOR, W.A. Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, n.9, p.1132-1138, 2001.

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. (Ed.) **Effect-directed analysis of complex environmental contamination**. Editora Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. Chap.15, p.69-82. (The handbook of environmental chemistry).

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A.; RECH, C.M.; SATO, M.I.Z.; 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, p.1589-1597, 2004.

UMBUZEIRO, G.A.; VARGAS, V.M.F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: Lucia Regina Ribeiro, Daisy Maria Fávero Salvadori e Edmundo Kanan Marques (Ed.). **Mutagênese Ambiental**. Editora da ULBRA, 2003. Capítulo 4, p. 81-112

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.

## APÊNDICE

Tabela A 1 - Resultados para o ensaio Salmonella com a fração Nitro-HPA.

### TA98

Dose (m3)	Sem S9					Com S9				
	P1	P2	P3	Média	RM	P1	P2	P3	Média	RM
<b>Cont. negativo</b>	27	23	27	26		32	20	28	27	
<b>0,02</b>	17	21		19	0,7	25	15		20	0,8
<b>0,2</b>	19	18		19	0,7	21	16		19	0,7
<b>1</b>	31	20		26	1,0	17	12		15	0,5
<b>2</b>	24	23		24	0,9	16	29		23	0,8
<b>5</b>	57	52		55	2,1	18	12		15	0,6
<b>10</b>	67	90		79	3,1	17	22		20	0,7
<b>Cont. positivo (ug/placa)</b>	367	384		376		769	1125		947	

RM = razão de mutagenicidade

### YG1041

Dose (m3)	Sem S9					Com S9				
	P1	P2	P3	Média	RM	P1	P2	P3	Média	RM
<b>Cont. negativo</b>	124	122	104	117		83	106	101	97	
<b>0,02</b>	108	132		120	1,0	99	99		99	1,0
<b>0,2</b>	248	257		253	2,2	106	76		91	0,9
<b>1</b>	1724	2166		1945	16,7	128	116		122	1,3
<b>2</b>	2023	-		2023	17,3	146	258		202	2,1
<b>5</b>	2493	2750		2622	22,5	363	415		389	4,0
<b>10</b>	4218	3120		3669	31,4	1182	883		1033	10,7
<b>Cont. positivo (ug/placa)</b>	1852	2109		1981		2750	1952		2351	

- = dose não testada

RM = razão de mutagenicidade

**TA1538**

Dose (m3)	Sem S9					Com S9				
	P1	P2	P3	Média	RM	P1	P2	P3	Média	RM
<b>Cont. negativo</b>	15	15	17	16		19	27	19	22	
<b>0,02</b>	9	13		11	0,7	18	20		19	0,9
<b>0,2</b>	20	13		17	1,1	17	29		23	1,1
<b>1</b>	49	53		51	3,3	18	24		21	1,0
<b>2</b>	37	55		46	2,9	19	14		17	0,8
<b>5</b>	172	123		148	9,4	33	45		39	1,8
<b>10</b>	274	279		277	17,6	60	82		71	3,3
<b>Cont. positivo (ug/placa)</b>	405	393		399		1724	1510		1617	

- = dose não testada

RM = razão de mutagenicidade

**YG5161**

Dose (m3)	Sem S9					Com S9				
	P1	P2	P3	Média	RM	P1	P2	P3	Média	RM
<b>Cont. negativo</b>	34	25	21	27		29	18	19	22	
<b>0,02</b>	21	28		25	0,9	29	29		29	1,3
<b>0,2</b>	16	30		23	0,9	26	25		26	1,2
<b>1</b>	44	53		49	1,8	24	21		23	1,0
<b>2</b>	42	52		47	1,8	30	22		26	1,2
<b>5</b>	155	120		138	5,2	46	46		46	2,1
<b>10</b>	125	135		130	4,9	37	63		50	2,3
<b>Cont. positivo (ug/placa)</b>	755	897		826		1453	2793		2123	

RM = razão de mutagenicidade

Tabela A 2 - Resultados para o ensaio Salmonella com a fração Oxi-HPA.

**TA98**

Dose (m3)	Sem S9					Com S9				
	P1	P2	P3	Média	RM	P1	P2	P3	Média	RM
<b>Cont. negativo</b>	25	24	25	25		24	21	22	22	
<b>0,02</b>	32	31		32	1,3	28	20		24	1,1
<b>0,2</b>	45	46		46	1,8	16	24		20	0,9
<b>1</b>	80	59		70	2,8	24	22		23	1,0
<b>2</b>	161	132		147	5,9	36	26		31	1,4
<b>5</b>	271	224		248	10,0	24	36		30	1,3
<b>10</b>	372	897		635	25,7	38	48		43	1,9
<b>Cont. positivo (ug/placa)</b>	1134	924		1029		1540	2128		1834	

RM = razão de mutagenicidade

**YG1041**

Dose (m3)	Sem S9					Com S9				
	P1	P2	P3	Média	RM	P1	P2	P3	Média	RM
<b>Cont. negativo</b>	205	193	214	204		118	98	98	105	
<b>0,02</b>	219	199		209	1,0	103	86		95	0,9
<b>0,2</b>	686	618		652	3,2	114	117		116	1,1
<b>1</b>	2835	2921		2878	14,1	325	311		318	3,0
<b>2</b>	3220	3576		3398	16,7	1239	1097		1168	11,2
<b>5</b>	5643	4346		4995	24,5	2479	2579		2529	24,2
<b>10</b>	-	-		-	-	6426	7011		6719	64,2
<b>Cont. positivo (ug/placa)</b>	1653	2793		2223		2023	2650		2337	

- = dose não testada

RM = razão de mutagenicidade

## TA1538

Dose (m3)	Sem S9					Com S9				
	P1	P2	P3	Média	RM	P1	P2	P3	Média	RM
<b>Cont. negativo</b>	20	17	15	17		16	17	25	19	
<b>0,02</b>	25	12		19	1,1	15	21		18	0,9
<b>0,2</b>	22	32		27	1,6	15	33		24	1,2
<b>1</b>	74	76		75	4,3	21	-		21	1,1
<b>2</b>	159	137		148	8,5	47	38		43	2,2
<b>5</b>	226	216		221	12,8	73	54		64	3,3
<b>10</b>	-	-		-	-	390	331		361	18,6
<b>Cont. positivo (ug/placa)</b>	215	230		223		2593	2664		2629	

- = dose não testada

RM = razão de mutagenicidade

## YG5161

Dose (m3)	Sem S9					Com S9				
	P1	P2	P3	Média	RM	P1	P2	P3	Média	RM
<b>Cont. negativo</b>	27	23	23	24		14	16	20	17	
<b>0,02</b>	26	25		26	1,0	16	13		15	0,9
<b>0,2</b>	26	21		24	1,0	16	14		15	0,9
<b>1</b>	84	76		80	3,3	15	22		19	1,1
<b>2</b>	148	180		164	6,7	51	35		43	2,6
<b>5</b>	266	189		228	9,3	64	50		57	3,4
<b>10</b>	-	-		-	-	508	510		509	30,5
<b>Cont. positivo (ug/placa)</b>	912	883		898		3776	3548		3662	

- = dose não testada

RM = razão de mutagenicidade

Tabela A 3 - Resultados para o ensaio Salmonella com a fração HPA.

**TA98**

Dose (m3)	Sem S9					Com S9				
	P1	P2	P3	Média	RM	P1	P2	P3	Média	RM
<b>Cont. negativo</b>	28	16	17	20		24	13	18	18	
<b>0,02</b>	25	25		25	1,2	29	24		27	1,4
<b>0,2</b>	26	27		27	1,3	12	14		13	0,7
<b>1</b>	-	-		-	-	-	-		-	-
<b>2</b>	26	-		26	1,3	30	19		25	1,3
<b>5</b>	15	36		26	1,3	20	28		24	1,3
<b>10</b>	37	44		41	2,0	33	34		34	1,8
<b>Cont. positivo (ug/placa)</b>	616	854		735		1358	1568		1463	

- = dose não testada

RM = razão de mutagenicidade

**YG1041**

Dose (m3)	Sem S9					Com S9				
	P1	P2	P3	Média	RM	P1	P2	P3	Média	RM
<b>Cont. negativo</b>	133	144	147	141		103	125	131	120	
<b>0,02</b>	136	218		177	1,3	128	112		120	1,0
<b>0,2</b>	125	148		137	1,0	-	-		-	-
<b>1</b>	209	333		271	1,9	-	-		-	-
<b>2</b>	151	158		155	1,1	119	109		114	1,0
<b>5</b>	158	151		155	1,1	132	179		156	1,3
<b>10</b>	142	229		186	1,3	181	188		185	1,5
<b>Cont. positivo (ug/placa)</b>	896			896		896			896	

- = dose não testada

RM = razão de mutagenicidade

**TA1538**

Dose (m3)	Sem S9					Com S9				
	P1	P2	P3	Média	RM	P1	P2	P3	Média	RM
<b>Cont. negativo</b>	20	21	30	24		21	12	24	19	
<b>0,02</b>	12	35		24	1,0	16	10		13	0,7
<b>0,2</b>	19	10		15	0,6	15	17		16	0,8
<b>1</b>	16	18		17	0,7	-	-		-	-
<b>2</b>	29	19		24	1,0	19	40		30	1,6
<b>5</b>	11	18		15	0,6	32	37		35	1,8
<b>10</b>	28	39		34	1,4	49	48		49	2,6
<b>Cont. positivo (ug/placa)</b>	490	406		448		1736	2310		2023	

- = dose não testada

RM = razão de mutagenicidade

**YG5161**

Dose (m3)	Sem S9					Com S9				
	P1	P2	P3	Média	RM	P1	P2	P3	Média	RM
<b>Cont. negativo</b>	36	44	27	36		22	25	18	22	
<b>0,02</b>	31	23		27	0,8	23	26		25	1,1
<b>0,2</b>	15	33		24	0,7	26	35		31	1,4
<b>1</b>	24	32		28	0,8	17	19		18	0,8
<b>2</b>	26	23		25	0,7	34	36		35	1,6
<b>5</b>	36	39		38	1,1	65	58		62	2,8
<b>10</b>	62	49		56	1,6	75	68		72	3,3
<b>Cont. positivo (ug/placa)</b>	616			616		5278	4746		5012	

RM = razão de mutagenicidade

Tabela A 4 - Potência mutagênica (rev.m-3) para as frações estudadas.

<b>Fração Nitro-HPA</b>		
<b>Linhagem</b>	<b>sem S9</b>	<b>com S9</b>
<b>TA98</b>	5,6	0,1
<b>YG1041</b>	680	70
<b>TA1538</b>	25	4
<b>YG5161</b>	13	2,9

<b>Fração Oxi-HPA</b>		
<b>Linhagem</b>	<b>sem S9</b>	<b>com S9</b>
<b>TA98</b>	53	2,2
<b>YG1041</b>	2600	200
<b>TA1538</b>	47	9
<b>YG5161</b>	61	9,8

<b>Fração HPA</b>		
<b>Linhagem</b>	<b>sem S9</b>	<b>com S9</b>
<b>TA98</b>	1,5	0,6
<b>YG1041</b>	5	6,7
<b>TA1538</b>	1,4	3,5
<b>YG5161</b>	2,4	5,5