



Avaliação da mutagenicidade dos sedimentos de dragagem do Porto de Santos utilizando o teste de AMES miniaturizado

Ana Laura Fragoso Favoreti ^{a*}, Francine Inforçato Vacchi ^{a**}, Gisela de Aragão Umbuzeiro ^{a***}

^a Faculdade de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas, Limeira, SP, Brasil

*E-mail (autora): a165989@dac.unicamp.br

**E-mail (coorientadora): francinevacchi@gmail.com

***E-mail (orientadora): giselau@unicamp.br

Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Resumo

Os sedimentos são fontes importantes para o monitoramento ambiental nos sistemas aquáticos, devido suas propriedades de adsorção e o acúmulo de substâncias químicas, podendo servir como indicativo de contaminação. O Porto de Santos (Santos, SP) tem influência econômica significativa no Brasil, mas possui altas taxas de contaminação devido a descargas de efluentes sem tratamento adequado, atividades industriais e navegações, e alguns estudos indicaram presença de toxicidade para organismos aquáticos na região. Levando em consideração o histórico de interferência na qualidade da água e da vida aquática, o objetivo deste projeto é avaliar a mutagenicidade dos sedimentos na região do Porto de Santos, utilizando-se o ensaio Salmonella/microsoma em sua versão miniaturizada - MPA (*Microplate Agar*) com presença e ausência de ativação metabólica (fornecida por S9 fígado de rato). Foram analisadas 9 amostras (3 amostras-controle e 6 amostras dos sedimentos de dragagem) em concentração única (5 mg eq./ μ L) utilizando as linhagens diagnósticas TA98, YG5185 e YG1041 da bactéria *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Todas as linhagens responderam adequadamente aos controles positivo e negativo, e a viabilidade do ensaio. Os ensaios em concentração única não mostraram toxicidade para as amostras testadas nas linhagens YG5185 e TA98. Porém, para a linhagem YG1041 foi detectada mutagenicidade no branco da extração e nos pontos controle, possivelmente devido a contaminação da amostra, fato que impossibilitou a validação de todos os ensaios realizados. Para uma próxima abordagem com amostras de sedimento, recomenda-se a realização prévia de ensaios com os controles e o branco da extração para as linhagens de teste.

Palavras-chave: linhagens; *Microplate Agar*; *Salmonella/microsoma*.

1. Introdução

Os sedimentos representam fontes importantes para análise de contaminantes em ambientes aquáticos, devido as suas características adsorção e acúmulo de compostos, podendo indicar contaminação e aferir resultados quanto as características físico-químicas da fonte contaminante (HORTELLANI et al., 2008). E são mais indicados para o monitoramento ambiental, devido a maior concentração de poluentes se comparado a coluna d'água (CESAR et al., 2006).

A Baixada Santista, localizada na região costeira do estado de São Paulo, abriga o Porto de Santos, o emissário submarino e regiões estuarinas, cuja biodiversidade encontra-se comprometida devido a intensa atividade de navegação e despejo de efluentes domésticos e industriais sem tratamento adequado (SOUSA et al., 2007). Os sedimentos do Porto de Santos têm apresentado, recorrentemente, altos níveis de contaminação por metais e compostos sintéticos (ABESSA et al., 1998; CESAR et al., 2006; SANTOS et al., 2018). Alguns estudos indicaram a presença de compostos mutagênicos da classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em concentrações elevadas em determinadas regiões (CETESB, 2002; KUMMROW, et al., 2006).

O Porto de Santos possui alta deposição de sedimentos, e conseqüentemente requer dragagem constante para permitir a navegação e o acesso ao portuário, visto que possui grande influência econômica no Brasil (ABESSA et al., 1998). Durante as operações de dragagem, um considerável volume de sedimentos contendo contaminantes é ressuspensionado na coluna d'água (TORRES et al., 2009) podendo interferir na qualidade da água e na vida biótica (UMBUZEIRO et al., 2006). É importante complementar a avaliação da qualidade desses sedimentos utilizando ferramentas baseadas em efeito (ALTENBURGER et al., 2015). O ensaio Salmonella/microsoma (teste de AMES) vem sendo utilizado no mundo todo para essa finalidade (ZEIGER, 2019; CHEN & WHITE, 2004; UMBUZEIRO et al., 2006).

O teste de AMES é realizado com diferentes linhagens, dentre elas cita-se a TA98, considerada a mais sensível para detecção de mutagenicidade de sedimentos (CHEN & WHITE, 2004), e as linhagens YG5185, sensível para HPA's (YAMADA, MATSUI & NOHMI, 2006), e YG1041 mais sensível para nitrocompostos e amins aromáticas, em comparação com a TA98 (WATANABE, ISHIDATE & NOHMI, 1989).

O protocolo a ser empregado nos ensaios deste projeto corresponde a uma nova versão miniaturizada do

ensaio *Salmonella*/microsoma em microsuspenção (ZWARG et al., 2018).

2. Objetivos

Avaliar a mutagenicidade de amostras dos sedimentos de dragagem do Porto de Santos, fornecidas pela empresa de Consultoria, Planejamento e Estudos Ambientais (CPEA), empregando o ensaio *Salmonella*/microsoma na versão miniaturizada, mediante o protocolo *Microplate Agar* (MPA).

3. Metodologia

3.1 Amostragem

As amostras foram fornecidas pela CPEA, sendo 3 amostras-controle (D1 a D3) e 6 amostras do material dragado (D4 a D9).

3.2 Extração orgânica por ultrassom

A extração orgânica do sedimento dragado foi realizada a partir do método de ultrassom (CETESB, 2008), utilizando 30 g de sedimento seco e adicionando 100 mL de fase extratora, constituída pelos solventes metanol (Sigma, CAS 67-56-1) e diclorometano (Sigma, CAS 75-09-2) na proporção 1:2,5 (v/v). Em seguida, a mistura foi colocada no ultrassom por 10 minutos e, ao final do processo, coletado o sobrenadante. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, adicionando somente a fase extratora na mesma amostra de sedimento.

Para remoção da água dos extratos orgânicos foi adicionado sulfato de sódio anidro na mistura e filtrado. Os extratos passaram por filtração em sistema a vácuo, em duas etapas: I) filtro AP20; II) membrana teflon 0,45 µm, cada etapa foi realizada duas vezes. Após o procedimento de remoção da água os extratos foram concentrados em evaporador rotativo até atingir cerca de 2-3 mL e secos em gás nitrogênio ultrapuro. Para uso nos ensaios, os extratos orgânicos secos foram avolumados em diclorometano (DCM), numa solução estoque concentrada de 10 mg equivalentes de sedimento por µL.

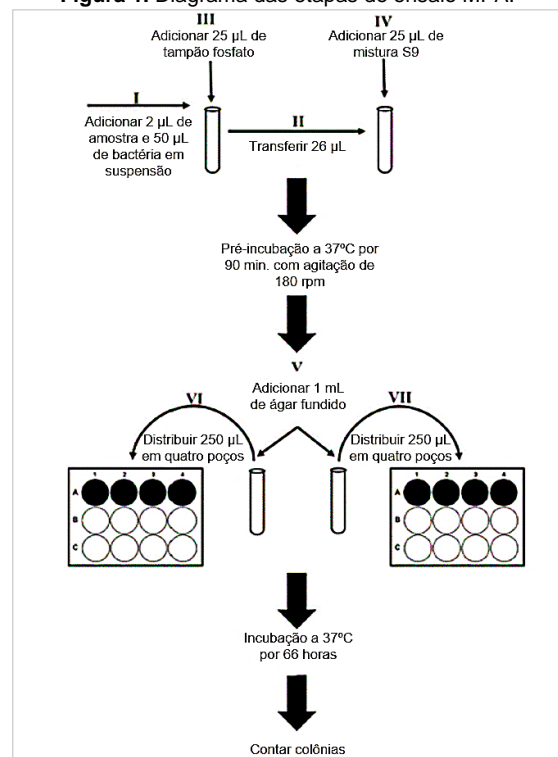
3.3 Ensaio *Salmonella*/microsoma miniaturizado

Os extratos orgânicos de dragagem foram testados utilizando três linhagens diagnósticas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (TA98, YG5185 e YG1041), de acordo com a versão miniaturizada do protocolo em microsuspenção (KADO; LANGLEY; EISENSTADT, 1983) desenvolvido através da substituição de placas de petri por microplacas de 12 poços (ZWARG et al., 2018), como mostra a Figura 1. O uso de diferentes linhagens diagnósticas possibilita identificar diferentes grupos de compostos, uma vez que possuem diferentes características genéticas.

Os ensaios foram conduzidos em concentração única de 5 mg eq./µL. No dia anterior ao ensaio, foram adicionados 50 µL da solução estoque dissolvida em DCM (concentração 10 mg equivalentes de sedimento por µL) e 2 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em tubos de ensaio, obtendo uma massa de 500 mg equivalentes de sedimento em cada tubo. O DCM evaporou, concentrando o extrato em 250 mg eq./µL.

Concentrou-se as culturas bacterianas *overnight* em cinco vezes, por centrifugação à 10.000 g a 4°C por 10 minutos e ressuspendidas em 4 mL de solução tampão fosfato 0,2M diluído 1/13. Foram adicionados 50 µL da linhagem bacteriana nos tubos contendo 2 µL de amostra diluída em DMSO (250 mg equivalentes por µL) e foram transferidos 26 µL para outro tubo. O ensaio foi conduzido com presença e ausência de ativação metabólica (mistura S9, contendo 5% de fração S9 fígado de rato induzido com Aroclor 1254 preparada de acordo com MORTELMANS & ZEIGER, 2000), e foram adicionados, respectivamente, 25 µL de mistura S9 em um tubo e 25 µL de solução tampão 1/13 em outro e, portanto, a concentração teste foi de 5 mg eq./µL. Os tubos foram incubados em um agitador a 180 rpm por 90 min a 37 °C. Posteriormente, foram adicionados 1 mL de solução top ágar aos tubos e 250 µL do conteúdo (amostra + bactéria + tampão ou S9 + top ágar) e distribuídos em 4 poços da microplaca, contendo 2,8 mL de ágar mínimo cada. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 66 h, e posteriormente contou-se o número de revertentes por placa. DMSO foi utilizado como controle negativo para todas as linhagens testadas. E o extrato de areia padrão da Sigma como branco da extração (Br). Os mutágenos utilizados como controle positivo e suas respectivas concentrações estão descritos na Tabela 1.

Figura 1. Diagrama das etapas do ensaio MPA.



Fonte: Adaptado de ZWARG et al. (2018).

Tabela 1. Controles positivos utilizados na ausência e presença de ativação metabólica (S9).

Linhasgens	Controles Positivos	
	-S9	+S9
TA 98	4NQO ^a (0,0625 µg.µL ⁻¹)	2AA ^b (0,25 µg.µL ⁻¹)
YG 5185	4NQO (0,0625 µg.µL ⁻¹)	BaP ^c (2,5 µg.µL ⁻¹)
YG 1041	4NOP ^d (1,0 µg.µL ⁻¹)	2AA (0,015 µg.µL ⁻¹)

^a4-nitroquinolina-1-óxido; ^b2-aminoantraceno; ^cbenzo(a)pireno; ^d4-nitro-o-diamino-fenilina.

3.4. Análise dos resultados

A análise dos resultados foi feita utilizando o software SALANAL (*Integrated Laboratory Systems, Research Triangle Park, NC*). O modelo compara cada amostra com seu respectivo controle negativo através da aplicação de análise de variância (ANOVA), seguido por regressão linear por aplicação do modelo de Bernstein (BERNSTEIN et al., 1982). Para as concentrações únicas foi aplicado ANOVA. Foram consideradas amostras mutagênicas quando a ANOVA apresentou diferenças significativas em relação ao controle negativo (significativo a 5%).

5. Resultados e discussões

Os controles positivos (Tabela 1) e negativo (DMSO) consistem, respectivamente, em uma substância conhecida que, sob determinada concentração, apresenta resposta mutagênica positiva e negativa para a linhagem. Já o Br (branco da extração) representa todos os constituintes utilizados na extração orgânica, com ausência do extrato de sedimento, e tem a finalidade verificar possíveis interferências de outros componentes na amostra.

Todas as linhagens testadas responderam adequadamente aos seus respectivos controles positivos e negativo (Tabela 2). A viabilidade das linhagens mostrou-se dentro da faixa esperada (50-200 revertentes por placa). O Br respondeu adequadamente para as linhagens TA98 e YG5185, e o teste não apresentou mutagenicidade para ambas as linhagens, na concentração testada (5mg eq./µL).

Os parâmetros controle positivo, controle negativo, viabilidade e branco da extração são necessários para que haja a legitimação dos ensaios em relação ao funcionamento adequado das bactérias e a verificação de interferentes na amostra. Já os ensaios com a linhagem YG1041 apresentaram mutagenicidade nos pontos controles e no Br (Tabela 2 – amostras Br, D1 e D2). Esse fato indicou possível contaminação no processo de extração, tornando os resultados negativos/positivos obtidos até então, para todas os extratos avaliados, questionáveis e inválidos.

Recomenda-se para testes futuros com sedimentos ensaios preliminares com as linhagens mais sensíveis para os controles e o branco da extração, visando garantir a validação e confiabilidade dos ensaios.

Tabela 2. Resultados do ensaio MPA na ausência e presença de ativação metabólica para as linhagens TA98, YG5185 e YG1041.

Amostras (Concentração 5 mg eq./µL)	Número de revertentes por placa			
	TA98			
	-S9		+S9	
	Média	DP	Média	DP
CN	5.75	0.50	4.25	1.26
Br	3.50	1.29	2.75	1.71
D1	5.75	2.22	4.75	2.63
D2	3.25	1.71	3.00	0.82
D3	3.00	1.83	4.50	1.91
D4 a D9	NR	NR	NR	NR
CP	80.00	3.16*	136.00	23.57*
CN	1.75	0.96	1.75	1.50
D4	3.75	1.50	4.00	1.41
D5	2.25	2.50	3.00	2.16
D6	4.00	1.83	4.25	0.50
D7	3.50	2.38	3.25	2.06
D8	2.25	0.50	2.25	1.26
D9	3.00	0.82	4.25	2.22
CP	78.75	16.40**	150.00	0.00*

Amostras (Concentração 5 mg eq./µL)	Número de revertentes por placa			
	YG5185			
	-S9		+S9	
	Média	DP	Média	DP
CN	2.50	1.29	1.50	1.29
Br	4.25	2.75	3.50	1.00
D1	2.25	0.50	3.25	1.50
D2	1.75	1.71	2.75	1.71
D3	3.00	3.37	2.50	1.91
D4	3.75	1.50	2.75	0.50
D5	3.25	2.06	3.75	2.06
D6	2.50	2.38	2.50	1.29
D7	3.50	1.73	2.75	3.10
D8	3.25	0.50	2.75	1.50
D9	2.00	2.00	2.50	1.00
CP	52.75	4.50*	150.0	0.00*

Amostras (Concentração 5 mg eq./µL)	Número de revertentes por placa			
	YG1041			
	-S9		+S9	
	Média	DP	Média	DP
CN	6.75	2.06	13.25	2.63
Br	24.00	6.48*	13.25	2.06
D1	14.75	1.89*	12.50	4.20
D2	15.00	2.16*	11.75	1.50
D3	12.75	3.10	14.25	4.03
D4	10.75	1.71	10.75	3.50
D5	12.50	3.11	9.75	2.99
D6	9.50	1.29	13.50	2.38
D7	10.00	1.41	12.25	5.80
D8	16.75	4.86	14.00	4.55
D9	10.75	2.87	12.25	2.63
CP	94.50	10.28**	150.00	0.00*

Br – Branco; CN – Controle negativo; CP – Controle positivo; D1, D2 e D3 – pontos controle da amostra; D4 a D9 – sedimento de dragagem; DP – Desvio padrão; NR – Não realizado; S9 – Ativação metabólica; ** significativo a 1%; * significativo a 5% (mutagênico).

4. Considerações finais

Inicialmente, os ensaios com as linhagens YG5185 e TA98 não indicaram presença de mutagenicidade nas amostras testadas. Numa abordagem subsequente, com a linhagem YG1041, observou-se a presença de mutagenicidade no branco da extração, indicando a possível contaminação das amostras, o que tornou os dados obtidos até então

questionáveis e inválidos. Portanto, a caracterização de mutagenicidade dos sedimentos de dragagem do Porto de Santos deste projeto não pode ser concretizada.

Agradecimentos

Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG) - Faculdade de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

- ABESSA, Denis M. S. et al. Use of the burrowing amphipod *Tiburonella viscana* as a tool in marine sediments contamination assessment. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 41, n. 2, p. 225–230, 1998.
- ALTENBURGER, Rolf et al. Future water quality monitoring — Adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management *Sci. Total Environ.* v. 512–513, p. 540–551, 2015.
- BERNSTEIN, Leslie et al. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. *Mutation Research*, v. 97, n. 4, p. 267–81, 1982.
- CESAR, Augusto et al. Ecotoxicological Assessment of Sediments From the Santos and São Vicente Estuarine System – Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 54, n.1, p. 55–63, 2006.
- CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo 2001. São Paulo: CETESB, 2002.
- CETESB. COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Preparo de amostras – Extração por ultrassom SQ PR/LB-149. São Paulo: CETESB, 2008.
- CHEN, Gousheng; WHITE, Paul. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutation Research*, p. 151–225, 2004.
- HORTELLANI, Marcos A. et al. Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do Estuário Santos – São Vicente. *Química Nova*, v. 31, n. 1, p. 10–19, 2008.
- 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, n. 1, p. 25–32, 1983.
- KUMMROW, Fábio et al. Blue rayon e teste Salmonella/microsoma na avaliação da qualidade de águas costeiras. *Revista de Saúde Pública*, v. 40, n. 5, p. 890-897, 2006.
- MORTELMANS, Kristien; ZEIGER, Errol. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 455, n. 1–2, p. 29–60, 2000.
- SANTOS, Dayana M. et al. Multiresidue determination and predicted risk assessment of contaminants of emerging concern in marine sediments from the vicinities of submarine sewage outfalls. *Marine Pollution Bulletin*, v. 129, n. 1, p. 299-307, 2018.
- SOUSA, Eduinety C. P. M et al. Ecotoxicological assessment of sediments from the Port of Santos and the disposal sites of dredged material. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 55, n. 2, p. 75–81, 2007.
- TORRES, Ronaldo J. et al. Effects of dredging operations on sediment quality: contaminant mobilization in dredged sediments from the Port of Santos, SP, Brazil. *Journal of Soils and Sediments*, v. 9, n. 5, p. 420–432, 2009.
- UMBUZEIRO, Gisela de A. et al. Evaluation of the water genotoxicity from Santos Estuary (Brazil) in relation to the sediment contamination and effluent discharges. *Environment International*, v. 32, n. 3, p. 359–364, 2006.
- WATANABE, Masahiko; ISHIDATE, Motoi Jr.; NOHMI, Takehiko. A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, v. 226, n. 4, p. 211–220, 1989.
- YAMADA, Masami; MATSUI, Keiko; NOHMI, Takehiko. Development of a Bacterial Hyper-sensitive Tester Strain for Specific Detection of the Genotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Genes and Environment*, v. 28, n. 1, p. 23–30, 2006.
- ZEIGER, Errol. The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 841, p. 43–48, 2019.
- ZWARG, José R. R. M. et al. Miniaturization of the microsuspension Salmonella/microsome assay in agar microplates. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 59, n. 6, p. 488–501, 2018.