

TESTE DE AMES COMO UMA FERRAMENTA PARA DETECÇÃO DE CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE CAUSADAS POR METAIS PESADOS E RADICAIS LIVRES

KELLY CRISTINA TAGLIARI¹
RUBENS CECCHINI²
HALHA OSTRENSKY SARIDAKIS³

TAGLIARI, K.C., CECCHINI, R., SARIDAKIS, H. O. Teste de ames como uma ferramenta para detecção de citotoxicidade e mutagenicidade causadas por metais pesados e radicais livres. *Semina: Ci. Biol./Saúde*, Londrina, v.18/19, n.2. p. 41-50, jun. 1999.

RESUMO: Considerando a interação complexa entre diferentes compostos químicos e metais, a influência desses fenômenos sobre o ambiente e conseqüentemente, sobre o ser humano, esta revisão tem como objetivo mostrar que o teste de Ames ainda hoje, é uma ferramenta importante na detecção de mutágenos.

PALAVRAS-CHAVE: Teste de Ames, *Salmonella typhimurium*, metais pesados, radicais livres.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento, tanto urbano como industrial, acelerado nos últimos 25 anos, tem aumentado a complexidade das interações entre resíduos lançados no meio ambiente, provocando sérios problemas ecológicos e toxicológicos para a maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Um número significativo de substâncias químicas sintéticas tem sido produzido e colocado no mercado sem avaliação prévia de seu impacto ambiental, resultando muitas vezes na poluição do meio ambiente por contaminantes tóxicos, colocando em risco a saúde humana e a integridade do ecossistema (CETESB, 1992).

Teste de Ames

Entre os vários bioensaios "*in vitro*" de curta duração, o teste de Ames (*Salmonella typhimurium* *his*⁻ reversion assay), que detecta mutações gênicas, tem sido o mais comumente utilizado na determinação da capacidade mutagênica de grande variedade de substâncias químicas e misturas complexas, além de propiciar correlação com a carcinogenicidade. É um dos testes de triagem

recomendados pela EPA (órgão de Controle Ambiental dos Estados Unidos) para uso em programas de monitoramento e controle da poluição ambiental (água, ar, material particulado, sedimento, resíduos sólidos e efluentes industriais), conforme CETESB (1992).

O ensaio foi desenvolvido por Dr. Bruce N. Ames e colaboradores na década de 70 (Ames, 1971 e Ames et al., 1975) e revisado por Maron & Ames, (1983). Esses trabalhos apresentam as principais orientações e recomendações para a realização do ensaio e interpretação dos resultados. O teste baseia-se na utilização de diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium*, derivadas da linhagem parental LT2, auxotrófica para histidina (*his*⁻), especialmente construídas para detectar mutações gênicas no DNA, como deslocamento do quadro de leitura ("frameshift") ou substituição de pares de base ("base pair substitution"). Estas cepas incapazes de crescer em meio mínimo, isento de histidina, tornam-se prototróficas para histidina, após a exposição de uma população, a um agente mutagênico. Neste teste pode ser incluído um sistema de ativação metabólica (mistura S9) para detecção de promutágenos ou mutágenos indiretos (Maron & Ames, 1983 e CETESB, 1992).

¹ Mestre em Microbiologia pelo Depto. de Microbiologia - CCB - Universidade Estadual de Londrina.

² Docente do Depto. de Ciências Patológicas - CCB - Universidade Estadual de Londrina.

³ Docente do Depto. de Microbiologia - CCB - Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid - PR 445, Cx. Postal: 6001, CEP: 86051-970 - Londrina - Paraná - Brasil - Fone: (043) 371-4494.

Segundo Ames & Mc Cann (1976) e Mc Cann & Ames (1977), a sensibilidade e a versatilidade das cepas utilizadas no teste de Ames são devidas às suas características genéticas descritas a seguir:

– A maioria das cepas apresenta uma deleção do gene *uvrB*, levando à perda da capacidade de reparo por excisão e aumento da sensibilidade das mesmas para detecção de mutágenos (Alper & Ames, 1975);

– Algumas cepas contêm o plasmídeo pKM101 que, além de conferir resistência à ampicilina, contém o gene *muc*, cuja expressão causa um estímulo no sistema de reparo suscetível ao erro ("error prone") normalmente presente nesses microrganismos, pois o produto desse gene interfere na fidelidade da DNA polimerase (Mc Cann et al., 1975; Hollstein et al., 1979; Maron & Ames, 1983);

– Todas as cepas apresentam a mutação denominada *rfa* a qual leva à perda parcial da barreira osmótica dos lipopolissacarídeos da parede bacteriana, facilitando a difusão de moléculas grandes, como aminas aromáticas, hidrocarbonetos policíclicos e aflatoxinas, para dentro da célula (Ames et al., 1975);

– São várias as cepas indicadoras descritas, sendo as mais utilizadas: TA1535, TA100, TA98, TA1537, TA97a e TA102 (Maron & Ames, 1983).

Existem outras cepas de *S. typhimurium* desenvolvidas pelo grupo do Dr. Ames e por outros pesquisadores com diferentes aplicações, porém, são utilizadas com menor frequência. Um exemplo é a cepa TA104, que contém a mutação "ocre" *hisG428* no cromossomo bacteriano, que detecta preferencialmente compostos oxidantes e aldeídos, similarmente à cepa TA102 (Levin et al., 1982). Outro exemplo, é a cepa SO1007 que apresenta a mutação "ambar" no gene *trpD28* e foi desenvolvida por Balbinder & Kerry (1984). Esta cepa pode ser usada como indicador não específico de mutagênese, pois é capaz de sofrer reversão por diversas classes de mutágenos.

Existem cepas variantes da TA98 e da TA100, as quais podem ser usadas no estudo de nitrocompostos. As cepas TA98NR e TA100NR, foram isoladas por Mermelstein et al. (1981) e são nitroredutases (NR) deficientes, ou seja, não possuem as enzimas envolvidas na bioativação de metabólitos produzidos pela redução de compostos nitroaromáticos. Mc Coy et al. (1981), isolaram a cepa TA98/1,8DNP-6, deficiente quanto à produção da enzima acetil CoA:amina aromática N-acetiltransferase (NAT), envolvida também na bioativação de metabólitos provenientes da acetilação de compostos nitroaromáticos.

A validação do teste de Ames, como instrumento confiável na avaliação de carcinógenos e/ou

mutágenos, foi realizada exaustivamente como pode ser observado nos trabalhos de Mohn (1981), Purchase (1982), Quillardet & Hofnung (1988), Le Curieux et al. (1993) e Benigni et al. (1995). Este sistema tem sido amplamente empregado na determinação da mutagenicidade de grande número de compostos químicos puros ou fracionados, sendo que até o ano 1982 já haviam sido testados mais de 5.000 produtos, conforme citado no Environmental Mutagen Information Center Index (EMIC), USA, 1982 (Maron & Ames, 1983).

O teste de Ames detecta aproximadamente 80 a 85% de mutágenos ambientais, no entanto falha na detecção de alguns cancerígenos conhecidos. Entre eles podemos citar o dietilestilbestrol (tóxico para bactérias), pesticidas clorados e alguns metais cancerígenos, especialmente os derivados de cromo hexavalente. Entretanto, com a introdução de mutações adicionais nas cepas originais, o teste tornou-se mais sensível, permitindo a detecção de vários produtos mutagênicos e/ou cancerígenos (vários compostos oxidantes, aldeídos, peróxido de hidrogênio, formaldeído, glutaraldeído, hidro- asbestos, hidrocarbonetos policíclicos, mitomicina C, bleomicina, etc.) os quais anteriormente eram negativos ou fracamente detectados neste teste (Maron & Ames, 1983).

O teste de Ames vem sendo o principal método empregado na avaliação de mutagenicidade de produtos químicos puros (Mortelmans et al., 1986 e Abe & Urano, 1994), de amostras atmosféricas (Hughes et al., 1980) e de amostras ambientais líquidas, tanto efluentes industriais como de corpos d'água que os recebem, além de água tratada (Meier, 1988; Vargas, 1988).

A mutagenicidade de amostras de águas para consumo (tratadas) tem sido amplamente avaliada pelo teste de Ames sendo que das cinco cepas originalmente recomendadas por Ames et al. (1975), para uma avaliação rotineira, TA98 e TA100 são as mais sensíveis. Isto é esperado, uma vez que estas cepas são as mais sensíveis para mutágenos em geral. Dependendo do objetivo do estudo, o uso de várias cepas-teste na avaliação da mutagenicidade pode ser supérfluo uma vez que, uma resposta positiva em algumas delas é suficiente para classificar o produto analisado como mutagênico (Meier, 1988).

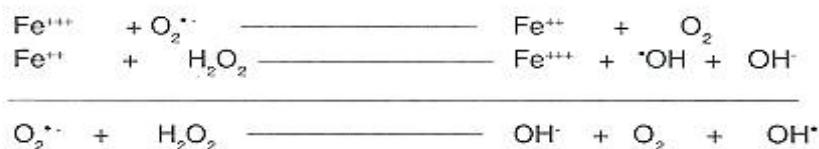
Radicais livres

Os elétrons, nos átomos, ocupam regiões do espaço, chamadas orbitais. Cada orbital pode ter no máximo 2 elétrons e, normalmente, para uma molécula permanecer estável, é necessária a presença de 2 elétrons pareados no seu orbital externo. Radical livre ou espécie reativa de oxigênio,

é qualquer molécula capaz de existência independente, a qual contém um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital de valência. Estas moléculas são altamente reativas, reagem com moléculas não radicais transformando-as em radicais, provocando uma reação em cadeia com duas etapas distintas: iniciação e propagação (Halliwell & Gutteridge, 1989a; Halliwell, 1991).

Os radicais livres possuem numerosas atividades biológicas, podendo destruir lipídios, proteínas e ácidos nucleicos e reagir com praticamente todas as moléculas biológicas, além de inativar as defesas antioxidantes das células. Os radicais livres de oxigênio são substâncias envolvidas em reações metabólicas celulares, que determinam lesão tecidual no curso de um amplo espectro de condições e doenças, tais como câncer, esclerose múltipla, doença de Parkinson, arteriosclerose e doenças autoimunes (Halliwell & Gutteridge, 1989c).

A mutagenicidade por radicais livres de oxigênio foi estudada por diversos autores que descreveram o O_2 como um agente com grande potencial genotóxico, capaz de induzir aberrações cromossômicas, mutações e trocas de cromátides-irmãs em uma variedade de tipos celulares. A genotoxicidade do peróxido de hidrogênio é provavelmente mediada pelo radical hidroxil que se liga ao DNA através de metais de transição, enquanto que a genotoxicidade do próprio O_2 ainda não está clara (Moody & Hassan, 1982; Meneghini, 1988; Joenje, 1989). Segundo Ames (1983), radicais livres de oxigênio são iniciadores endógenos de processos degenerativos, assim como causadores de danos e mutações no DNA, os quais podem estar relacionados a câncer, doenças cardíacas e envelhecimento.



A produção de radicais livres é permanente dentro do ser vivo, mas a principal fonte de produção está associada ao metabolismo celular de oxigênio e às reações de oxirredução tais como: na autooxidação de pequenas moléculas (tióis, hidroquinonas, catecolaminas, flavinas); pela NADPH oxidase; no transporte mitocondrial de elétrons; pelo retículo endoplasmático; na membrana plasmática; pelas células fagocíticas, entre outros (Mason et al., 1980; Capdevilla et al., 1981; Freemam & Crapo, 1982 e Halliwell & Gutteridge, 1989c).

Existem vários mecanismos de defesa natural contra os radicais livres, porém, quando a

As espécies reativas de oxigênio capazes de causar danos oxidativos incluem: ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$); radical hidroperoxil (HO_2^{\bullet}), forma protonada do radical superóxido; peróxido de hidrogênio (H_2O_2); radical hidroxil ($\bullet OH$); radical alcoxil (RO^{\bullet}); radical peroxil (ROO^{\bullet}); hidroperóxidos orgânicos ($ROOH$) e o oxigênio "singlet" (1O_2). O termo espécies reativas de oxigênio refere-se aos radicais centrados no oxigênio ($O_2^{\bullet -}$ e $\bullet OH$) e também aos agentes oxidantes produzidos nos sistemas biológicos que não são radicais livres porquanto não apresentam elétrons desemparelhados. Enquadram-se nesta categoria peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) e, a forma altamente reativa do oxigênio, conhecida como oxigênio "singlet" (1O_2) (Halliwell, 1991).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), não apresenta elétrons desemparelhados e portanto, não é um radical. Porém, sua importância na lesão celular se deve à capacidade de gerar produtos mais reativos, como o radical hidroxil ($\bullet OH$), na presença de $Fe(II)$, por meio da reação de Fenton. Qualquer sistema produtor de radical superóxido, pode sofrer reações para produzir H_2O_2 por dismutação espontânea ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (Halliwell & Gutteridge, 1989b). O peróxido de hidrogênio pode atravessar as membranas celulares rapidamente, enquanto que o radical superóxido somente o faz através de canais aniônicos (Takahashi & Asada, 1983). O radical hidroxil, "in vivo", também pode ser formado através de reações de íons de metais de transição $Fe(II)$, $Cu(I)$ com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), via reações de Fenton-Haber-Weiss (Halliwell & Gutteridge, 1989a):

concentração de espécies reativas de oxigênio excede os níveis celulares basais, ocorre o estresse oxidativo, ou seja, a capacidade de defesa da célula, contra espécies reativas de oxigênio, é superada (Farr & Kogoma, 1991).

Organismos unicelulares, assim como multicelulares, estão sujeitos às mesmas condições causadoras de estresse oxidativo: alterações ambientais de pH ou temperatura, exposição a agentes químicos tóxicos e radiação. Em bactérias, os alvos das espécies reativas de oxigênio são lipídios, proteínas, DNA e RNA. A oxidação de lipídios pode resultar na alteração da membrana celular o que afeta a produção de energia e captação

de nutrientes para a célula. Danos oxidativos nos aminoácidos, podem afetar estruturas da parede celular e as funções de proteínas internas e externas. Espécies reativas de oxigênio podem atuar diretamente sobre o DNA, causando inúmeras lesões como alteração ou remoção de bases nitrogenadas e quebras na fita, acarretando mutagenicidade ou bloqueio na replicação nos organismos afetados (Cunningham & Ahern, 1995).

Metais Pesados

O desenvolvimento de indústrias modernas tem acarretado uma propagação mundial de metais tóxicos no meio ambiente e não é novidade que esses agentes, inclusive metais pesados, podem interagir sinergicamente (Léonard et al., 1984).

Os riscos para a humanidade, dependem não somente da toxicidade inerente a cada metal, mas também de sua captação e transferência ao ambiente e de sua metabolização no organismo humano. Portanto, a simples determinação química das possíveis substâncias tóxicas presentes em uma amostra não é suficiente para avaliar seus efeitos de mutagenicidade (Léonard et al., 1984 e CETESB, 1992).

Dentre os diferentes compostos químicos poluentes, alguns são capazes de promover alterações estruturais significativas nas moléculas de DNA. Algumas dessas alterações, se não corrigidas pelos sistemas enzimáticos intracelulares de reparo, podem levar à inativação da célula ou à ativação do funcionamento incorreto de sistemas de reparo, os quais conduzem, durante o processo de replicação semi-conservativa, a erros de emparelhamento, isto é, modificações do conteúdo informacional, culminando em mutação (Leitão & Alcântara, 1987; Henriques et al., 1987; Rabelo-Gay et al., 1991).

A capacidade mutagênica e a carcinogenicidade de alguns metais já estão bem caracterizadas, enquanto que para outros há necessidade de maiores estudos. Várias evidências têm demonstrado que metais de transição, atuam como catalisadores na deterioração oxidativa de macromoléculas biológicas e na toxicidade de muitos xenobióticos (Stohs, 1995).

O cromo é um elemento abundante na crosta terrestre e ocorre nos estados de oxidação de Cr^{2+} a Cr^{6+} , porém, somente as formas trivalente e hexavalente são biologicamente importantes. Este metal é extensivamente utilizado em indústrias metalúrgicas de aço inoxidável, ligas, placas elétricas, revestimentos, tintas e na produção de cromatos e dicromatos (Léonard et al., 1984 e Goyer, 1991).

O cromo é amplamente conhecido por causar dermatites alérgicas, bem como, efeitos tóxicos e

carcinogênicos em humanos e animais. Quando aspirado por humanos, pode causar câncer nas vias respiratórias e tem a capacidade de atravessar a placenta causando mal-formações fetais. Atualmente, não se conhece exatamente o nível do íon cromato que pode ser tolerado pelo homem durante toda vida sem efeitos prejudiciais, mas, com base na ocorrência e nos efeitos encontrados, foi estabelecido 0,05 ppm como limite aceitável para que as águas, com essa concentração de cromo hexavalente, possam ser consumidas durante a vida inteira, e de 0,03 a 0,2 mg/dia, 10 ng/m³, 10 a 300 ng/m³ em alimentos, atmosfera rural e urbana, respectivamente (Léonard, 1984; CETESB, 1988; Goyer, 1991 e Stohs, 1995).

O cromo trivalente é a forma mais abundante encontrada na natureza e não há evidências da sua conversão em cromo hexavalente nos sistemas biológicos. O íon cromato $[CrO_4]^{2-}$, a forma dominante do Cr (VI) em soluções aquosas, atravessa rapidamente a membrana celular via canais não-específicos de ânions e é reduzido intracelularmente à forma trivalente. A forma hexavalente é encontrada como mutagênica na maioria dos estudos realizados, enquanto que a forma trivalente, até recentemente, era considerada relativamente inativa (Stohs, 1995). Entretanto, alguns autores sugerem que a forma responsável pela ação mutagênica do cromo seja a trivalente, a qual se liga ao material genético celular após redução a partir da forma hexavalente (Goyer, 1991). Além disso, pode ocorrer que o Cr(III) seja reduzido a Cr(II) pelos redutores biológicos NADH e L-cisteína. Esta forma Cr(II), reagiria com H_2O_2 formando radicais livres ($\cdot OH$), os quais são responsáveis por danos teciduais (Ozawa & Hanaki, 1990). Complexos de Cr(III) mostraram efeito mutagênico no teste de Ames e relaxamento do superenovelamento do DNA, provavelmente devido a formação de radicais de oxigênio como intermediários ativos (Sugden et al., 1992).

Shi & Dalal (1989), concluíram que o Cr(V), formado pela redução do Cr(VI), através de redutores celulares, reage com H_2O_2 formando radical hidroxil, numa reação semelhante à de Fenton. Outros autores observaram que radicais hidroxil, formados pelo intermediário Cr(V), causaram quebras no DNA (Jones et al., 1991).

Segundo Stohs (1995), tanto o Cr(VI) como o Cr(V) são estados oxidados do Cr, biologicamente ativos, estando ambos envolvidos no ciclo redox, com produção de espécies reativas de oxigênio.

O ferro está presente na natureza e em seu estado reduzido (Fe^{2+}) é muito mais freqüente nas águas subterrâneas do que nas águas superficiais, visto que a presença de oxigênio nas águas

superficiais resulta na sua oxidação para óxido de ferro hidratado, o qual é muito menos solúvel. A quantidade nutricional de ferro para adultos é da ordem de 1 a 2 mg/dia, sempre que a absorção for normal. Um problema acarretado por este metal é que sua presença nas águas de abastecimento, permite o desenvolvimento de ferro-bactérias, as quais produzem odores fétidos e pigmentos vermelho, verde escuro ou negro, além de obstruírem as canalizações (Batalha & Parlato, 1977).

Além do mais, o ferro é importante na geração de radicais livres através da reação de Fenton-Haber-Weiss. Vários autores têm confirmado que a lipoperoxidação de membranas biológicas, lesão de proteínas e ácidos nucleicos, exige tanto Fe^{3+} como Fe^{2+} , provavelmente como um complexo $Fe-O_2$ e também como participante na formação de outras moléculas reativas (Aust, 1989; Halliwell & Gutteridge, 1989c).

Uma variedade de xenobióticos aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio, tanto pelo próprio ciclo redox do ferro como pela liberação de ferro livre das biomoléculas que o contêm. Experimentos utilizando redução fotoquímica de Fe^{3+} a Fe^{2+} e quelantes como citrato, nitrilotriacetato e EDTA, demonstraram que o Fe^{2+} , radical hidroxil e espécies reativas outras estão envolvidos na indução de danos ao DNA de macrófagos (Ryan & Aust, 1992; Chao & Aust, 1993).

O cobre geralmente está presente na natureza e nos tecidos de animais e vegetais. As formas de cloreto, sulfato e nitrato são muito solúveis em água, não acontecendo o mesmo com carbonato, hidróxido, óxido e sulfeto. Os íons de cobre que se encontram em valores de pH igual ou superior a 7, em águas naturais, precipitam o carbonato e o hidróxido e são assim removíveis por adsorção ou sedimentação (Batalha & Parlato, 1977).

O cobre é um metal benéfico ao metabolismo humano e a sua deficiência produz anemia nutricional em crianças. As necessidades diárias de cobre para um adulto são estimadas em 2 mg/l. Comumente, os alimentos contêm valores acima de 10 mg/Kg e alguns, como o fígado, certas verduras e ostras, apresentam um conteúdo maior, variando entre 20 a 50 mg/Kg (Batalha & Parlato, 1977).

O cobre não é considerado um tóxico de efeito cumulativo, como o chumbo ou o mercúrio, uma vez que é eliminado através de urina e fezes. Contudo, concentrações elevadas podem produzir vômitos e a ingestão oral muito prolongada pode ocasionar danos ao fígado. Em quantidades excessivas, é tóxico a ampla variedade de espécies aquáticas, desde bactérias a peixes. As concentrações de cobre encontradas, normalmente, no ambiente podem ser prejudiciais à vida aquática,

tanto que é empregado como algicida em tratamento de águas. Os padrões de qualidade de água para consumo humano, preconizados pela Organização Mundial de Saúde (1971), recomendam como teores máximos desejáveis e permissível, respectivamente, 0,05 mg/L e 1,5 mg/L (Batalha & Parlato, 1977 e CETESB, 1988).

O cobre, similarmente ao ferro, atua como catalisador na formação de espécies reativas de oxigênio e na lipoperoxidação de membranas (Chan et al., 1982).

Estudos de mutagenicidade, utilizando o teste de Ames, demonstraram que o acetato cúprico quando foi adicionado à adriamicina, aumentou a capacidade mutagênica desta última em mais de 700%, demonstrando assim o potencial genotóxico do cobre (Yourtee et al., 1992).

2. IMPORTÂNCIA DA DETECÇÃO DE MUTÁGENOS NO MEIO AMBIENTE

Dos contaminantes ambientais, os mutagênicos e carcinogênicos de natureza química parecem constituir a maior ameaça à saúde humana, considerando o dano que podem provocar ao material genético das futuras gerações (CETESB, 1992). Além dos danos diretos aos humanos, são atingidas a microbiota, a flora e a fauna dos diferentes ecossistemas, levando ao declínio da qualidade de vida no planeta.

A detecção de mutágenos no ambiente tem importância principalmente quanto a dois aspectos: a carcinogênese e as doenças hereditárias (Valent, 1990). Mutágenos, agindo em células germinativas (basicamente óvulos e espermatozoides), causam modificações no material genético as quais podem aumentar a incidência de doenças genéticas. Dessas doenças, as mais facilmente identificadas nas populações, são as de caráter dominante e aquelas causadas por aberrações cromossômicas (Saxena, 1984). Por outro lado, mutações em células somáticas são potencialmente carcinogênicas. Durante os últimos 30 anos evidências têm sido acumuladas mostrando que o câncer é uma doença genética e que pode ser entendida como resultado de várias mutações que se acumulam no DNA de uma única célula somática, levando à perda do controle de crescimento (Watson et al., 1987; Brusick, 1994).

Muitas evidências teóricas e experimentais sugerem que doenças neoplásicas surgem através de uma série de etapas complexas, começando com a transformação de células normais em anormais ao nível genético, devido a alterações específicas no DNA, produzindo lesões em genes que controlam o crescimento celular (Gumttec,

1986; Williams & Weisburger, 1991). Há evidências de que um grande número de câncer em humanos tem causa ambiental, mais ligada à veiculação de substâncias químicas, tornando a detecção de carcinógenos químicos uma necessidade premente. Isto não demonstra necessariamente que um composto sendo mutagênico, também será carcinogênico. A correlação, entretanto, existe e o conhecimento de que um composto é mutagênico em um sistema bacteriano, serve como alerta (Brock et al., 1994).

Mais uma demonstração de que o ambiente desempenha papel fundamental na etiologia do câncer é o fato de que 92% dos tipos encontrados atualmente são carcinoma, câncer que se desenvolve a partir das células epiteliais, que recobrem a superfície dos órgãos (pele, intestino, pulmão, etc.), justamente os tecidos que estão em contato com o ambiente através de ar, alimento e água. Além disso, a incidência dos diversos tipos de câncer varia tanto geográfica como ocupacionalmente (Watson et al., 1987). Poluentes químicos industriais são considerados responsáveis por cerca de 1 a 5% de todos os tipos de câncer, podendo ser este quadro tão crítico que venha a atingir até 25%. Assim, é possível inferir que quanto maior a exposição de indivíduos a agentes mutagênicos, maior será a incidência de câncer nessa população (Lee et al., 1981).

Os compostos mutagênicos presentes no meio ambiente podem ser tanto de origem natural (ex.: toxinas de microrganismos) como de origem antrópica (ex.: efluentes industriais, agrotóxicos), levando à formação de misturas complexas. Para se ter uma idéia da complexidade das amostras ambientais, como água bruta por exemplo, em termos de diversidade de poluentes orgânicos, Kraybill et al. (1979) encontraram e identificaram 729 compostos orgânicos diferentes nesse tipo de amostra. O número de compostos que pode estar presente na água de consumo após tratamento, pode exceder a 1200 (Bull, 1981).

Um problema alarmante para o homem é que muitos compostos mutagênicos são estáveis durante períodos relativamente longos, portanto dificilmente degradados, persistindo no ambiente e/ou bioacumulando-se. A bioacumulação fornece o grau de contaminação dos diversos organismos e permite o fluxo da substância química ao longo da cadeia alimentar (Moutschen, 1985; Houk, 1992).

A contaminação do meio ambiente por agentes agudamente tóxicos é facilmente detectada devido ao efeito imediato, permitindo controle rápido da fonte emissora. Substâncias tóxicas crônicas produzem danos a longo prazo, reduzindo a sobrevivência dos organismos, influenciando na sua

reprodução, ou ainda, alterando o patrimônio genético. Uma fonte de atividade genotóxica e/ou carcinogênica somente pode ser detectada após a exposição de muitas pessoas por vários anos, o que ressalta a necessidade de uma ação preventiva (Zimmermann et al., 1984).

Existem várias maneiras de observar a relação entre doenças e exposição dos indivíduos a amostras ambientais, tais como água ou ar. O estudo epidemiológico é o método mais direto para demonstrar essa correlação porém está sujeito a muitas limitações, uma vez que estes estudos são raros, extremamente caros e na maioria das vezes geram resultados duvidosos, não permitindo conclusões definitivas, devido à forma pela qual são conduzidos (Tye & Waite, 1981).

Uma alternativa tradicional para detectar mutágenos ou carcinógenos é a inoculação em animais suscetíveis, de amostras ou compostos e a demonstração de mutações ou indução de tumores após a exposição (testes "in vivo"). Essa maneira é mais rápida que os estudos epidemiológicos, entretanto, estes ensaios envolvem o uso de muitos animais, são trabalhosos e onerosos, dificultando a avaliação de um grande número de amostras em curto espaço de tempo (Tye & Waite, 1981).

Em vista das dificuldades de realização dos ensaios epidemiológicos "in vivo", foram desenvolvidos vários métodos "in vitro", em especial utilizando-se microrganismos, os quais têm se mostrado como uma boa alternativa no monitoramento de um grande número de amostras ambientais (Tye & Waite, 1981). Dentre suas vantagens é preciso citar a simplicidade, a sensibilidade na detecção dos danos genéticos, baixo custo, uso de pequena quantidade de amostra e alta reprodutibilidade (HOUK, 1992).

Os bioensaios utilizados para avaliar os efeitos e riscos à saúde são baseados no uso de compostos subcelulares (ex.: enzimas, DNA, RNA), células isoladas (ex.: culturas celulares, hemácias) ou animais. A nível bioquímico e molecular podemos destacar os bioensaios de mutagenicidade e citotoxicidade relativos aos efeitos e riscos à saúde humana causados por compostos químicos ou misturas complexas, os quais devido a suas interações com mecanismos genéticos, podem causar mutações e aumento da incidência de doenças crônicas nas populações (CETESB, 1992).

Esses bioensaios permitem o estabelecimento do perfil da atividade mutagênica de uma substância, servindo como indicador de qualquer modificação sofrida pelo composto, como resultado de um processo industrial ou de sua passagem através de diferentes sistemas biológicos. Os

mesmos indicadores são ainda úteis no monitoramento de populações pois, servem como primeiro alerta antes que evidências epidemiológicas possam ser detectadas (CETESB, 1992).

Entre os vários bioensaios propostos, os ensaios microbianos "in vitro", têm-se mostrado bastante adequados na triagem rotineira de produtos químicos e amostras ambientais (água, ar, solo, lixiviados de resíduos sólidos, cosméticos, alimentos, corantes, medicamentos, antibióticos, etc.) e atualmente são considerados parte essencial dos testes toxicológicos a serem realizados em amostras onde se deseja conhecer sua atividade mutagênica e/ou oncogênica (CETESB, 1992).

Atualmente os testes de mutagenicidade mais utilizados em amostras ambientais são os que utilizam bactérias e em especial, o teste de Ames (Valent, 1990). Os resultados obtidos de bioensaios genéticos de curta duração são importantes para a espécie humana, uma vez que o alvo genético-toxicológico é o DNA, existente em todas as formas de vida, servindo assim para demonstrar que compostos eletrofilicos, reagindo com o DNA de uma dada espécie, têm o potencial de produzir efeito similar em outra espécie (Saxena, 1984; Henriques et al., 1987; Rabelo-Gay et al., 1991; Houk, 1992).

3. ATIVIDADE MUTAGÊNICA DE METAIS PESADOS E COMPOSTOS GERADORES DE RADICIAS LIVRES DETECTADA ATRAVÉS DO TESTE DE AMES

Levin et al. (1984), estudaram a mutagenicidade do peróxido de hidrogênio e outros compostos oxidantes, através do teste de Ames, utilizando a cepa TA102, pelos métodos de pré-incubação e de incorporação em placa. Todos os compostos testados foram mutagênicos para a cepa TA102 nos dois métodos utilizados, com exceção do "neocarzinostatin" que foi tóxico pelo método de pré-incubação. Foi observado maior número de revertentes (*his*⁺) pelo método de pré-incubação para a maioria dos compostos. Para o peróxido de hidrogênio e peróxido de metil etil cetona o número de *his*⁺ observado foi maior pelo método de incorporação em placa.

A capacidade mutagênica de compostos geradores de radicais livres foi avaliada por Hassan & Moody (1984), através de diferentes métodos utilizados no teste de Ames. Foram utilizadas as cepas TA98, TA100, TA1535, TA1537 e TA1538, sem ativação metabólica uma vez que essa etapa é desnecessária para estudos com radicais livres. Pelo método da incorporação em placa, o composto químico paraquat (gerador de radicais), mostrou

fraca mutagenicidade uma vez que foi altamente tóxico para as cepas utilizadas o que impossibilitou uma relação dose-resposta. Este problema foi resolvido pela utilização do ensaio em meio líquido, o qual permite a contagem do número de revertentes (*his*⁺) em relação ao número de células sobreviventes possibilitando assim a detecção da mutagenicidade para um composto altamente tóxico.

Abu-Shakra & Zeiger (1990), avaliaram a mutagenicidade induzida pelo peróxido de hidrogênio em várias cepas de *S. typhimurium* utilizadas no teste de Ames, através dos métodos de pré-incubação e de incorporação em placa. A cepa SB1106p foi mais sensível na detecção do composto estudado do que as cepas construídas especificamente para detectar mutágenos oxidativos. A cepa TA100 variou de negativa a fracamente positiva nos experimentos realizados. O método de pré-incubação, na maioria dos casos, foi o mais sensível, ou seja, detectou maior número de *his*⁺.

De Flora et al. (1989), demonstraram a mutagenicidade de espécies reativas de oxigênio detectada pela cepa TA104 de *S. typhimurium* no teste de Ames. Estes autores concluíram que há necessidade da cepa apresentar mutação no gene *hisG428* e excisão do gene *uvrB* para que seja capaz de detectar mutações de oxi-radicalis.

Han (1992), avaliou quais espécies reativas de oxigênio contribuíam para a reversão da cepa TA104 induzida pelo peróxido de hidrogênio. Os resultados obtidos indicaram que radicais hidroxil gerados pela reação de Fenton e talvez o oxigênio "singlet" eram os que mais contribuíam para o efeito mutagênico do peróxido de hidrogênio. Entretanto, catalase e superóxido dismutase incluídas na reação, não inibiram os efeitos mutagênicos, o que levou os autores a inferirem que radicais superóxido e o próprio peróxido de hidrogênio não eram os indutores da reversão na cepa estudada.

O potencial mutagênico de 16 derivados de metais foi estudado por Marzin & Phi (1985), através do teste de Ames, pelo método de incorporação em placa, utilizando a cepa TA102 de *S. typhimurium*. Esses autores observaram que somente dois compostos de Cr(VI) foram mutagênicos para a cepa TA102 e que seus potenciais mutagênicos eram semelhantes.

Codina et al. (1995), compararam a eficácia na detecção da capacidade mutagênica de metais pesados, em quatro diferentes testes microbianos: teste de Ames, de *Escherichia coli* WP2, de detecção da mutagenicidade Mutatox e teste SOS. Todos os metais testados (cádmio, cobre, cromo, mercúrio, níquel e zinco) foram caracterizados como genotóxicos nos testes Mutatox e SOS. Os testes de Ames e de *E. coli* WP2 detectaram somente o cromo como genotóxico.

Pagano & Zeiger (1992), observaram a mutagenicidade de cloreto de cobalto, sulfato ferroso, sulfato de manganês, cloreto de cádmio e cloreto de zinco, pelo método de pré-incubação, utilizando a cepa TA97. Quando a exposição era feita em água destilada e deionizada estéril ou tampão Hepes, os resultados foram melhores quando comparados aos testes que utilizaram o tampão fosfato de sódio descrito na técnica padrão. Foi observado também que os componentes do meio de Vogel-Bonner inibiram a mutagenicidade desses metais.

4. CONCLUSÕES

Como conclusão pode-se afirmar que nenhum ensaio é por si só suficiente para caracterizar uma substância ou composto como mutagênico (ou citotóxico) e que não existe ensaio capaz de determinar todos os mutágenos conhecidos. O teste de Ames, apresenta reprodutibilidade, baixo custo, aplicação generalizada (cepas específicas) e análise de várias amostras em curto espaço de tempo, características que facilitam comparação entre vários resultados como essencial em qualquer rotina.

TAGLIARI, K.C., CECCHINI, R., SARIDAKIS, H. O. Ames test as a tool for detection of citotoxicity and mutagenicity caused by heavy metals and free radicals. *Semina: Ci. Biol./Saúde*, Londrina, v.18/19, n.2, p. 41-50, jun. 1999.

ABSTRACT: *The aim of these review is to show the use of Ames Test as an important tool in the detection of mutagens, particularly when considering the complex interaction among different chemical compounds and metals, the influence of these on the environmental as well as on human being.*

KEY WORDS: *Ames Test, Salmonella typhimurium, heavy metals, free radicals.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, A., URANO, K. Influence of chemicals commonly found in a water environmental on the *Salmonella* mutagenicity test. *Sci. Total Environ.*, v.153, p.169-75, 1994.
- ABU-SHAKRA, A., ZEIGER, E. Effects of *Salmonella* genotypes and testing protocols on H₂O₂- induced mutation. *Mutagenesis*, v.5, p.469-473, 1990.
- ALPER, M. D., AMES, B. N. Positive selection of mutants with deletions of the gal-chl region of the *Salmonella* chromosome as a screening procedure for mutagens that cause deletions. *J. Bacteriol.*, v.121, p.259-66, 1975.
- AMES, B. N. The detection of mutagens with enteric bacteria. In: HOLLAENDER, A. *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*. New York: Plenum, 1971. v.1, p.267-82.
- AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*, v.22, p.1256-64, 1983.
- AMES, B. N., MC CANN, J., YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mut. Res.*, v.31, p.347-64, 1975.
- AMES, B. N., MC CANN, J. Carcinogens are mutagens, a simple test system. In: MENTSANDO, R., TOMATIS, L. *Screening tests in chemical carcinogenesis*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1976. v.12, p.493-504.
- AUST, S. D. Metal ions, oxygen radicals and tissue damage. *Bibl. Nutr. Diet.*, v.43, p.266-77, 1989.
- BALBINDER, E., KERRY, D. A new strain of *Salmonella typhimurium* reverted by mitomycin C and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine - a possible universal tester strain for mutagenic compounds. *Mutat. Res.*, v.130, p.315-20, 1984.
- BATALHA, B. L., PARLATORE, A. C. Requisitos de qualidade de água para consumo humano: análise conceitual e comparativa. In: CETESB. *Controle da Qualidade da Água para Consumo Humano - Bases Conceituais e Operacionais*. São Paulo, 1977. p.65-172.
- BENIGNI, R., ANDREOLI, C., GIULIANI, A. Relationships among in vitro mutagenicity assays: quantitative vs. qualitative test results. *Environ. Mol. Mutagen.*, v.26, p.155-62, 1995.
- BROCK, T. D., MADIGAN, M. T., MARTINKO, M., PARKER, J. *Biology of Microorganisms*. 7.ed. [S.l.] Prentice Hall International, 1994.
- BRUSICK, D. Genetic toxicology. In: HAYNES, A.W. *Principles and Methods of Toxicology*. 3.ed. New York: Raven Press, 1994. Cap. 15, p.545-77.
- BULL, R.J. Is drinking water a significant source of human exposure to chemical carcinogens and mutagens? In: WATERS, M.D. *Short term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures*. Washington: Plenum, 1981. v.2, p.135-9.

- CAPDEVILLA, J., PARKHILL, L., CHACOS, N. et al. The oxidative metabolism of arachidonic by purified cytochromes P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.101, p.1357, 1981.
- CETESB. *Aspectos Físicos e Químicos da Poluição das Águas*. São Paulo, 1988. Apostila de Treinamento a Distância - Recuperação da Qualidade das Águas.
- CETESB. *Bioensaios Microbianos Aplicados no Controle de Contaminantes Tóxicos Ambientais*. São Paulo, 1992. 76p.
- CHAN, P. C., PELLER, O. G., KESNER, L. Copper(II)-catalyzed lipid peroxidation in liposomes and erythrocyte membrane. *Lipids*, v.17, p.331-37, 1982.
- CHAO, C. C., AUST, A. E. Photochemical reduction of ferric iron by chelators results in DNA strand breaks. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.300, p.544-50, 1993.
- CODINA, J. C., PÉREZ-TORRENTE, C., PÉREZ-GARCÍA, A. et al. Comparison of microbial tests for the detection of heavy metal genotoxicity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.29, p.260-5, 1995.
- CUNNINGHAM, R. P., AHERN, H. Antioxidant Defenses of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. In: AHMAD, S. *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. New York: Chapman & Hall, 1995. p.273-97.
- DE FLORA, S., BENNICELLI, C., ZANACCHI, P. et al. Mutagenicity of active oxygen species in bacteria and its enzymatic or chemical inhibition. *Mutat. Res.*, v.214, p.153-8, 1989.
- FARR, S. B., KOGOMA, T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.*, v.55, p.561-85, 1991.
- FREEMAN, B. A., CRAPO, J. D. Biology of disease. *Lab. Invest.*, v.47, p.412-23, 1982.
- GOYER, R. A. Toxic effects of metals. In: AMDUR, M.O., DOULL, J., KLAANEM, C. *Toxicology: The basic science of poisons*. 14.ed. New York: Pergamon, 1991. p.623-80.
- GUMTTEC. *Guidelines on the use of mutagenicity tests in the toxicological evaluation of chemicals*. DNH & W/DOE Environmental Contaminants. Ottawa: Advisory Committee on Mutagenesis, 1986. 84p.
- HALLIWELL, B. Introduction to free radicals in human disease. *Saudi Med. J.*, v.12, p.13-19, 1991.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen is poisonous - an introduction to oxygen toxicity and free radicals. In: HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2.ed. Oxford: Clarendon, 1989a. p.1-21.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2.ed. Oxford: Clarendon, 1989b. p.188-276.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species. In: HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2.ed. Oxford: Clarendon, 1989c. p.22-85.
- HAN, J. Effects of various chemical compounds on spontaneous and hydrogen peroxide-induced reversion in strain TA104 of *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.*, v.266, p.77-84, 1992.
- HASSAN, H. M., MOODY, C. S. Determination of the Mutagenicity of Oxygen Free Radicals Using Microbial Systems. In: COLOWICK, S. P., KAPLAN, N. O. *Methods In Enzymology*. [Philadelphia] Academic Press, 1984. p.254-63.
- HENRIQUES, J. A. P., VALSA, J. O., GOMES, R. A. Utilização de testes com microorganismos para detecção de atividades mutagênicas e/ou potencialmente oncogênicas. In: COSTA, S. O. P. *Genética molecular de microrganismos*. São Paulo: Manole, 1987. p.330-50.
- HOLLSTEIN, M.J., MC CANN, D.A., NICHOLS, W.W. Short term tests for carcinogens and mutagens. *Mutat. Res.*, v.65, p.133-226, 1979.
- HOUK, V. S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents - a review. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v.277, p.91-138, 1992.
- HUGHES, T. J., PELLIZZARI, E., LITTLE, L. et al. Ambient air pollutants: Collection, chemical characterization and mutagenicity tests. *Mutat. Res.*, v.76, p.51-83, 1980.
- JOENJE, H. Genetic toxicology of oxygen. *Mutat. Res.*, v.219, p. 193-208, 1989.
- JONES, P., KORTENKAMP, A., O'BRIEN, P. et al. Evidence for the generation of hydroxyl radicals from a chromium(V) intermediate isolated from the reaction of chromate with glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.286, p.652-55, 1991.
- KRAYBILL, H. F., HELMES, C. T., SIGMAN, C. C. et al. Identification and classification of carcinogenic/mutagenic biorefractories in water and their probable risk. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ORGANIC COMPOUNDS IN WATER, São Paulo, 1979. *Anais...* São Paulo, 1979. p.3-7.
- LE CURIEX, F., MARZIN, D., ERB, F. Comparison of three short-term assays: results on seven chemicals. *Mutat. Res.*, v.319, p.223-36, 1993.
- LEE, E. G., MUELLER, J. C., WALDEN, C. C. et al. Mutagenic properties of pulp mill effluents. *Pulp Paper of Canada*, Montreal, v.82, p.69-77, 1981.
- LEITÃO, A. C., ALCÂNTARA, R. G. Mecanismos de reparação do DNA em *Escherichia coli*. In: COSTA, S. O. P. *Genética molecular de microrganismos*. São Paulo: Manole, 1987. p.135-65.
- LÉONARD, A., GERBER, G. B., JACQUET, P. et al. Carcinogenicity, mutagenicity, and teratogenicity of industrially used metals. In: KIRSCH-VOLDERS, M. *Mutagenicity, carcinogenicity, and teratogenicity of industrial pollutants*. New York: Plenum Press, 1984. p.59-103.
- LEVIN, D. E., HOLLSTEIN, M., CHRISTIMAN, M. F. et al. A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A.T base pair at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.79, p.7445-9, 1982.

- LEVIN, D.E., MARNETT, L. J., AMES, B. N. Spontaneous and mutagen-induced deletions: Mechanistic studies in *Salmonella* tester strain TA102. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.81, p.4457-61, 1984.
- MARON, D. M., AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, v.113, p.173-215, 1983.
- MARZIN, D. R., PHI, H. V. Study of the mutagenicity of metal derivatives with *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.*, v.155, p.49-51, 1985.
- MASON, R. P.; KALYANARAMAN, B.; TAINER, B. E. et al. A carbon-centered free radical intermediate in the prostaglandin synthase oxidation of arachidonic acid: spin trapping and oxygen uptake studies. *J. Biol. Chem.*, v.256, p.5019, 1980.
- Mc CANN, J., CHOI, E., YAMASAKI, E. et al. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.72, p.5135-9, 1975.
- Mc CANN, J., AMES, B. N. The *Salmonella*/microsome mutagenicity test: predictive value for animal carcinogenicity. In: HIATT, H. H.; WATSON, J. D.; WINSTEN, J. A. *Origins of Human Cancer*. New York: Cold Spring Harbor, 1977. p.1431-50.
- Mc COY, E. C., ROSENKRANZ, H. S., MERMELSTEIN, R. Evidence for the existence of a family of nitroreductases capable of activating nitrated polycyclic to mutagens. *Environ. Mutagen.*, v.3, p.421-7, 1981.
- MEIER, J. R. Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water. *Mutat. Res.*, v.198, p.211-45, 1988.
- MENEGHINI, R. Genotoxicity of active oxygen species in mammalian cells. *Mutat. Res.*, v.195, p. 215-30, 1988.
- MERMELSTEIN, R. D., KIRIAZIDES, K., BUTLER, M. et al. The extraordinary mutagenicity of nitropyrenes in bacteria. *Mutat. Res.*, v.89, p.187-96, 1981.
- MOHN, G.R. Bacterial systems for carcinogenicity testing. *Mutat. Res.*, v.87, p.191-210, 1981.
- MOODY, C. S.; HASSAN, H. M. Mutagenicity of oxygen free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.79, p.2855-9, 1982.
- MORTELMANS, K., HAWORTH, S., LAWLOR, T. et al. *Salmonella* mutagenicity tests. II. Results from the testing of 270 chemicals. *Environ. Mutagen.*, v.8, p.1-39, 1986.
- MOUTSCHEN, J. *Introduction to genetic toxicology*. Chichester: J. Wiley, 1985. 184p.
- OZAWA, T., HANAOKI, A. Spin-trapping studies on the reactions of Cr(III) with hydrogen peroxide in the presence of biological reductants: Is Cr(III) non-toxic? *Biochem. Int.*, v.22, p.343-52, 1990.
- PAGANO, D. A., ZEIGER, E. Conditions for detecting the mutagenicity of divalent metals in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mol. Mutagen.*, v.19, p.139-46, 1992.
- PURCHASE, I. F. H. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. An appraisal of predictive tests for carcinogenicity. *Mutat. Res.*, Amsterdam, n.99, p.53-71, 1982.
- QUILLARDET, P., HOFNUNG, M. The screening, diagnosis and evaluation of genotoxic agents with batteries of bacterial tests. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v.205, p.107-18, 1988.
- RABELO-GAY, M. N., RODRIGUES, M. A., MONTELEONE NETO, R. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. *Rev. Bras. Genet.*, v.1, p.246, 1991.
- RYAN, T. P., AUST, S. D. The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Crit. Rev. Toxicol.*, v.22, p.119-41, 1992.
- SAXENA, J. In vitro test systems for mutagenicity screening of environmental chemicals. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, v.15, p.1-16, 1984.
- SHI, X., DALAL, N. S. Chromium (V) and hydroxyl radical formation during the glutathione reductase-catalyzed reduction of chromium (VI). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.163, p.627-34, 1989.
- STOHS, S. J. Synthetic pro-oxidants: drugs, pesticides and other environmental pollutants. In: AHMAD, S. *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. New York: Chapman & Hall, 1995. p.117-80.
- SUGDEN, K. D., GERR, R. D., ROGERS, S. J. Oxygen radical-mediated DNA damage by redox-active Cr(III) complexes. *Biochemistry*, v.31, p.11626-31, 1992.
- TAKAHASHI, M. A., ASADA, K. Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.226, p.558-66, 1983.
- TYE, R. J., WAITE, W. M. Mutagens, carcinogens and the water cycle. *Water Pollut. Control*, v.80, p.600-12, 1981.
- VALENT, G.V. *Avaliação da atividade mutagênica de extratos orgânicos de corpos d'água do estado de São Paulo através do teste de Ames*. Campinas, 1990. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- VARGAS, V. M. F., MOTTA, V. E. P., HENRIQUES, J. A. P. Analysis of mutagenicity of waters under the influence petrochemical industrial complexes by the Ames test (*Salmonella* / Microsome). *Rev. Bras. Genet.*, v.11, n.3, p.505-18, 1988.
- WATSON, J. D., HOPKINS, N.; ROBERTS, J. W. et al. *Molecular Biology of the Gene*. 4.ed. Melopark: California, Benjamin Cummings, 1987. v.2, p.1058.
- WILLIAMS, G. M., WEISBURGER, J. H. Chemical carcinogenesis. In: AMDUR, M. O., DOULL, J., KLAANEM, C. *Toxicology: the basic science of poisons*. 14.ed. New York: Pergamon Press, 1991. p.127-200.
- YOURTEE, D. M., ELKINS, L. L., NALVARTE, E. L., SMITH, R. E. Amplification of doxorubicin mutagenicity by cupric ion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.116, p.57-65, 1992.
- ZIMMERMANN, F.K., BORSTEL R. C. VON, HALLE, E. S. VON. et al. Testing of chemicals for genetic activity with *S. cerevisiae*: a report of the US. Environmental Protection Agency Gene-Tox program. *Mutat. Res.*, v.133, p.199-244, 1984.