

CETESB	CROMOTESTE - ENSAIO BASEADO NA INDUÇÃO DO SISTEMA DE REPARO SOS PARA DETECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS GENOTÓXICAS	L5.300
	Método de ensaio	Set/92

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Normas complementares.....	3
3 Definições.....	3
4 Aparelhagem.....	4
5 Execução do ensaio.....	8
6 Resultados.....	23
7 Laudo técnico.....	24
8 Recomendações.....	24
Anexo A - Procedimentos complementares.....	27
Anexo B - Esquemas.....	30
Anexo C - Referências bibliográficas.....	33

INTRODUÇÃO

O acelerado crescimento urbano e industrial nos últimos anos tem aumentado a complexidade dos resíduos e produtos químicos tóxicos lançados no meio ambiente, provocando sérios problemas ecológicos e toxicológicos. Entre esses produtos incluem-se aditivos químicos, corantes, antissépticos, conservantes, defensivos agrícolas, fertilizantes, produtos químicos resultantes de processos industriais, etc. Muitos desses agentes químicos podem representar sérios riscos à saúde humana, sendo de especial importância os compostos genotóxicos. Esses compostos podem causar alterações a nível gênico ou cromossômico, levando ao aumento da incidência de câncer e doenças genéticas nas populações expostas. Além disso, vários autores têm reportado a forte correlação entre a habilidade de compostos serem genotóxicos em bactérias com propriedades mutagênicas e de iniciação de tumores em mamíferos. Com o objetivo de avaliar o potencial genotóxico de agentes químicos foram desenvolvidos ensaios "in vitro" que detectam direta ou indiretamente o dano causado por esses agentes ao material genético. Tais testes podem ser realizados tanto em microrganismos (bactérias e fungos) como em culturas de células de mamíferos, plantas e animais. Dentre os ensaios "in vitro" os testes bacterianos têm sido amplamente utilizados para detecção de agentes genotóxicos, sendo o ensaio de mutação gênica reversa com Salmonella typhimurium, denominado teste de Ames, o mais empregado.

Novos testes bacterianos têm sido propostos para a detecção de genotoxinas, entre eles o Cromoteste, ensaio desenvolvido na década de 80 por QUILLARDET e col. no Instituto Pasteur de Paris.

O Cromoteste emprega a linhagem de E. coli PQ 37, onde foi feita a fuusão do gene estrutural da β -galactosidase (lac Z) a um dos genes do sistema de reparo SOS, o gene sfi A ou sul A, um dos genes responsáveis pela filamentação bacteriana. O resultado dessa fusão gênica é a detecção através de ensaio enzimático de lesões no ADN bacteriano.

O Cromoteste tem sido principalmente utilizado para detecção de genotoxidade de produtos químicos, sendo mais recente a sua aplicação na análise de amostras ambientais como material particulado de ar e água bruta e tratada. Este teste apresenta algumas vantagens em relação ao teste de Ames, entre elas, a maior rapidez de resposta (6-8 horas) e pode ser aplicado com amostras não estéreis. Além disto, certos danos específicos tais como quebras da cadeia de ADN são preferencialmente detectadas por esse ensaio.

1 OBJETIVO

1.1 Esta Norma prescreve o Cromoteste, ensaio colorimétrico em tubos para detecção de substâncias genotóxicas baseado na indução das funções SOS.

1.2 O Cromoteste pode ser empregado para:

- a) controlar o processo de tratamento de água de abastecimento público em relação a:
 - remoção de compostos genotóxicos presentes nos mananciais que abastecem as estações de tratamento;
 - possível adição de substâncias genotóxicas durante o proceso de tratamento;
 - presença de substâncias genotóxicas na água de consumo;
- b) avaliar a eficiência dos processos de tratamento de esgoto e efluentes industriais na remoção desses compostos;
- c) avaliar aditivos, corantes ou outras substâncias utilizadas no preparo de alimentos, bem como o controle de medicamentos quanto a possíveis efeitos genotóxicos;
- d) caracterizar poluentes genotóxicos em estudos de impacto ambiental e proteção de ecossistemas, visando a tomada de medidas corretivas e preventivas;
- e) localizar fontes potenciais de compostos genotóxicos no ar, solo, água e alimentos, em áreas industrializadas, agrícolas e urbanas, visando o controle dos referidos poluentes.

2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- L5.215 - Prova de adequabilidade biológica de água destilada para fins microbiológicos (CETESB).
- L5.010 - Avaliação de laboratórios de análises microbiológicas de água (CETESB).
- NBR 9898 - Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores (ABNT)
- M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia (CETESB).
- L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura (CETESB).
- L5.009 - Segurança e higiene do trabalho em laboratórios de microbiologia ambiental (CETESB).
- Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, da CETESB.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.9.

3.1 ADN

Ácido desoxirribonucleico.

3.2 Filamentação bacteriana

Fenômeno que consiste no aumento progressivo das dimensões celulares, especialmente do comprimento, sem que ocorra septação. Em E. coli a formação de filamentos após tratamento com agentes físicos ou químicos depende dos produtos de dois genes, sfi A ou sul A e sfi B ou sul B.

3.3 Genotoxina ou agente genotóxico

Agentes químicos ou físicos que interagem com o ADN, causando alterações genéticas tais como mutação gênica ou cromossômica.

3.4 Mutação

Mecanismo biológico universal que promove modificações genéticas nos organismos. A nível molecular, é a alteração da molécula de ADN, resultando na formação de proteínas alteradas ou ausentes no organismo que sofreu a mutação.

3.5 Mutação rfa

Mutação que causa modificações na camada lipopolissacarídica da membrana celular bacteriana, propiciando uma maior permeabilidade da célula a moléculas grandes.

3.6 Mutação uvrA

Mutação causada por deleção de um dos genes responsáveis pelo reparo de

excisão, a qual impede a bactéria de reparar alguns tipos de danos causados ao ADN, tornando-a mais sensível a agentes mutagênicos.

3.7 Sistema de reparo SOS ou funções SOS

Sistema de reparo do ADN passível de erros que engloba um conjunto de respostas celulares codificadas por diferentes genes (rec A, lex A, sfi A, sfi B, uvr A, uvr B, uvr C, uvr D, umu C, umu D, etc.) cujo funcionamento é induzido quando surgem lesões no ADN.

3.8 p.a.

Para análise.

3.9 q.s.p.

Quantidade suficiente para.

4 APARELHAGEM

4.1 Agitador tipo Vortex

4.2 Alças de inoculação

De platina, com um comprimento de 7 a 8 cm e diâmetro de 0,5 mm, apresentando na extremidade uma parte encurvada, formando um aro com diâmetro mínimo de 3 mm; com cabo de metal (cabo de Kolle).

4.3 Ampolas

De borossilicato ("pyrex") ou vidro neutro, temperado, para congelamento a -196°C em nitrogênio líquido.

4.4 Autoclave

Deve ter tamanho suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado e ser equipada com válvula de segurança, manômetro e termômetro, cujo bulbo fique na direção de escape do vapor condensado (dreno). A autoclave é normalmente operada à pressão de vapor de 103 426 Pa (15 psi), produzindo em seu interior a temperatura de $121,6^{\circ}\text{C}$ ao nível do mar. Deve-se observar, em seu funcionamento, a substituição por vapor de todo o ar existente na câmara. A operação total de uma autoclave deve durar no máximo uma hora, sendo recomendado o acompanhamento dos ciclos de operação e os registros de tempo-temperatura. É recomendável que a autoclave atinja a temperatura de esterilização de 121°C em 30 minutos e mantenha essa temperatura durante o período de esterilização.

4.5 Balança analítica

Deve ter sensibilidade mínima de 1 mg ao pesar 10 g.

4.6 Balança semi-analítica

Deve ter sensibilidade mínima de 0,1 g ao pesar 150 g.

4.7 Banho-maria

Equipado com termostato para manutenção da temperatura a 55°C, com capacidade suficiente para comportar recipientes que contenham meios de cultura, cuja temperatura deva ser estabilizada antes de sua distribuição em placas de Petri.

4.8 Bico de Bunsen

Com funcionamento adequado para permitir uma combustão completa.

4.9 Capela de segurança biológica (câmara de fluxo laminar vertical)

Equipamento que possibilita a retenção de partículas do ar por um filtro adequado, sendo o ar filtrado dirigido em forma de fluxo direto sobre a área de trabalho. O equipamento deve ser de segurança biológica Classe II - tipo B, com exaustão externa que proporcione grande segurança nas manobras, as quais devem ser realizadas em condições de esterilidade, e na manipulação de pequenas quantidades de produtos voláteis perigosos.

4.10 Congeladores

Com regulagem para manter a temperatura no intervalo de -20°C e -70°C. Destina-se ao armazenamento de soluções e culturas de bactérias. Sua limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

4.11 Contador de colônias

Manual tipo Quebec.

4.12 Destilador de água ou aparelho para desionização

Deve produzir água não tóxica, livre de substâncias que interfiram na multiplicação bacteriana.

4.13 Erlenmeyers

De borossilicato ("pyrex") ou de vidro neutro, com tampa roscada, não tóxica, e capacidade de 125 mL.

4.14 Espectrofotômetro

Com monocromador de espectro contínuo na faixa visível de 420 nm, transmissão de 0-100% e absorvância de 0-2.

4.15 Estufa para esterilização e secagem

A estufa deve acondicionar pipetas, placas de Petri, frascos para coleta, tubos e toda vidraria e aparelhagem que possa ser esterilizada por calor seco, e ter capacidade suficiente para permitir a circulação do ar quente ao redor do material a ser esterilizado. Deve ser equipada com um termômetro e um termostato, e operar normalmente a uma tempera

tura de 170-180°C. O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de 2 horas, a uma temperatura de 170-180°C.

4.16 Filtros para esterilização

Tipo Swinnex, de polipropileno, com diâmetro de 13 mm.

4.17 Frascos de coleta

De borossilicato ("pyrex") ou vidro neutro, com capacidade de 5 L.

4.18 Frascos para soluções

De borossilicato ("Pyrex") ou vidro neutro, com tampa de rosca, não tóxica, com capacidade de 50 e 100 mL, e frascos âmbar, com capacidade de 30-50 mL.

4.19 Incubadora bacteriológica

Deve ser equipada com termostado e projetada de tal forma que a temperatura, em todas as partes utilizadas, seja 37°C; sua capacidade deve ser suficiente para permitir a circulação do ar ao redor de todas as culturas, quando o material de trabalho estiver sendo incubado. Para verificar a temperatura de uma incubadora grande devem ser colocados um ou mais termômetros, com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral, em lugares representativos da câmara e feitos registros periódicos da temperatura. A incubadora deve manter 75 a 85% de umidade relativa e ser colocada em local onde a temperatura permaneça no intervalo de 16 a 27°C.

4.20 Lâmpada germicida (UV)

Lâmpada germicida (UV), de 15 W.

4.21 Máscara de proteção respiratória contra gases

Equipada com filtro apropriado contra gases, ácidos e outros compostos voláteis, com proteção facial de acrílico.

4.22 Máscara de proteção respiratória contra pós tóxicos

Equipada com filtro apropriado contra pós tóxicos.

4.23 Mesa agitadora alternativa ("shaker")

Equipamento portátil de dimensão adequada para ser acondicionado na incubadora bacteriológica, capaz de imprimir de 100 a 200 movimentos por minuto. Deve conter garras apropriadas para frascos e tubos.

4.24 Micropipetadores

Pipetadores digitais com capacidade para medir volumes de 25, 50, 100, 200, 500 µL, com ponteiros de polipropileno apropriadas e autoclaváveis. As ponteiros devem ser embrulhadas em papel de alumínio e papel Kraft e esterilizadas em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

4.25 Pera de sucção

4.26 Pinças

De aço inoxidável, com extremidades arredondadas.

4.27 Pipetas

Pipetas tipo Mohr, de 1 mL, 5 mL e 10 mL, com graduação de 1/10, e erro de calibração inferior a 2,5%, e com bocal para tampão de algodão. Devem ser acondicionadas em caixas de aço inoxidável ou embrulhadas individualmente em papel Kraft, e esterilizadas por calor seco a 170-180°C durante duas horas.

4.28 Placas de Petri de vidro

De borossilicato ("pyrex") ou vidro neutro de boa qualidade, com fundo perfeitamente plano, sem ranhuras ou bolhas de ar; medindo 100 mm de diâmetro e 15 mm de altura. Devem ser embrulhadas em papel Kraft e esterilizadas por calor seco a 170-180°C por duas horas.

4.29 Porta-pipetas de aço inoxidável

4.30 Potenciômetro

Deve ter escala bem legível e medir com precisão de 0,1 unidade de pH. A calibração do potenciômetro deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia, com tampões de pH 4,00, pH 6,86 e pH 9,18.

4.31 Protetor facial

Protetor facial com cúpula e coroa de polietileno articulada, regulagem com catraca, viseira em acrílico, anatômico, incolor.

4.32 Refrigerador

Certificado para manter a temperatura no intervalo de 2 a 8°C; sua capacidade deve ser suficiente para conter os meios de cultura, soluções e amostras a serem mantidas sob refrigeração. Sua limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

4.33 Seringas descartáveis

4.34 Tela de amianto

De 22 x 22 cm.

4.35 Tripé

4.36 Tubos de ensaio

De borossilicato ("pyrex") ou vidro neutro, de medidas aproximadas de 18 x 180 mm e 15 x 150 mm, com tampas de aço inoxidável, e de medidas de 20 x 120 mm, com tampas de rosca de material não tóxico. Devem ser esterilizados por calor seco a 170-180°C, durante 2 horas, excluindo-se as tampas de rosca, que são embrulhadas individualmente em papel de alu

mínio e esterilizadas em autoclave a 121°C por 15 minutos.

4.37 Tubos para leitura espectrofotômetro

Devem ser de vidro de boa qualidade com dimensões adequadas para leitura em espectrofotômetro.

4.38 Vasilhame de nitrogênio líquido

Com capacidade para conservação de 50 litros de nitrogênio líquido à temperatura de -196°C e equipado com 6 recipientes para comportar as ampolas com culturas bacterianas.

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Princípio do método

O Cromoteste fundamenta-se na avaliação quantitativa de uma das funções do sistema de reparo SOS, a filimentação bacteriana. Para facilitar a medida da amplitude deste fenômeno, o gene estrutural da β -galactosidase, lac Z, foi colocado, através de técnicas de ADN recombinante, sob o controle do operador de um dos genes responsáveis pela filimentação bacteriana, sfi A. Desta forma, a determinação da quantidade de β -galactosidase sintetizada funciona como um indicador do nível de lesão causado ao ADN pela substância química ou amostra em teste.

5.2 Reagentes

5.2.1 Para a preparação dos meios de cultura e soluções utilizados neste ensaio são necessários os reagentes de 5.2.1.1 a 5.2.1.20.

- 5.2.1.1 Ácido clorídrico (HCl) p.a.
- 5.2.1.2 Ácido nítrico (HNO₃) p.a.
- 5.2.1.3 Ácido sulfúrico (H₂SO₄) p.a.
- 5.2.1.4 Ampicilina (Sigma)
- 5.2.1.5 Bacto agar (Difco)
- 5.2.1.6 Bacto extrato de levedura (Difco)
- 5.2.1.7 Bacto triptona (Difco)
- 5.2.1.8 Carbonato de sódio (Na₂CO₃) p.a.
- 5.2.1.9 Cloreto de sódio (NaCl) p.a.
- 5.2.1.10 Dimetilsulfóxido - DMSO ((CH₃)₂SO)
- 5.2.1.11 Fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) p.a.
- 5.2.1.12 Fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄ · H₂O) p.a.

5.2.1.13 MacConkey Agar

5.2.1.14 β -mercaptoetanol

5.2.1.15 p-nitrofenil fosfato dissódico (PNPP) (Sigma código: 104-0)

5.2.1.16 o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) (Sigma código: N-1127)

5.2.1.17 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) (Sigma código: N-8141)

5.2.1.18 "Sodium dodecyl sulphate" (SDS)

5.2.1.19 Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) p.a.

5.2.1.20 Tris (hidroximetil) aminometano ($C_4H_{11}NO_3$)

5.2.2 Os reagentes devem ser de grau p.a. ou bacteriológico e de procedência idônea, apresentar cor, consistência e odor inalterados, ser livres de elementos bactericidas ou bacteriostáticos inespecíficos, bem como de carboidratos inespecíficos.

5.3 Materiais

5.3.1 Fita crepe

5.3.2 Luvas cirúrgicas

5.3.3 Materiais para preparação de meios de cultura

Recipientes de vidro neutro ou aço inoxidável limpos e isentos de qualquer substância tóxica (nunca devem ser de cobre).

5.3.4 Membranas filtrantes estéreis

De éster de celulose, com porosidade de 0,20 μm e 13 mm de diâmetro.

5.3.5 Papel Kraft

5.3.6 Parafilme

Película termoplástica flexível e semitransparente, utilizada para vedação.

5.3.7 Placas de Petri descartáveis

Devem ser de boa qualidade, medindo 90 mm de diâmetro e 12 mm de altura. É essencial que a esterilização seja realizada pelo processo de raiogama cobalto (Co). Não devem ser utilizadas placas esterilizadas por processos químicos.

5.4 Meios de cultura

5.4.1 Caldo L

Fórmula:

Bacto triptona.....	10,0 g
Bacto extrato de levedura.....	5,0 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	10,0 g
Água destilada.....	1,0 L

Preparo:

Pesar os componentes e acrescentar 1,0 L de água destilada fria. Aquecer agitando freqüentemente até a completa dissolução dos ingredientes, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir alíquotas de 30 mL em erlenmeyers ou frascos secos de 125 mL com tampas rosqueadas, ou alíquotas de 5 mL, em tubos de 18 mm x 180 mm com tampas de aço inoxidável. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a autoclavação, os tubos que contêm o meio preparado podem ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 14 dias.

5.4.2 Caldo L com ampicilina (caldo La)Fórmula:

Bacto triptona.....	10,0 g
Bacto extrato de levedura.....	5,0 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	10,0 g
Solução de ampicilina 10 mg/mL.....	2,0 mL
Água destilada.....	1,0 L

Preparo:

Preparar o caldo La de acordo com o item 5.4.1 e, após autoclavação, estabilizar o meio à temperatura de 55°C em banho-maria e adicionar assepticamente 2 mL de solução de ampicilina 10 mg/mL para cada litro de meio, resultando em 20 µg de ampicilina para cada mL de caldo. Distribuir alíquotas de 30 mL em erlenmeyers de 125 mL com tampas rosqueadas, previamente esterilizados, ou alíquotas de 5 mL, em tubos de 18 x 180 mm, com tampa de aço inoxidável, previamente esterilizados. O caldo L com ampicilina poderá ser armazenado sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 14 dias.

5.4.3 Agar LFórmula:

Bacto triptona.....	10,0 g
Bacto extrato de levedura.....	5,0 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	10,0 g
Bacto agar.....	15,0 g
Água destilada.....	1,0 L

Preparo:

Pesar os componentes e acrescentar 1,0 L de água destilada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer agitando freqüentemente, até a completa dissolução dos ingredientes, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após esterilização, manter o meio preparado em banho-maria para esta estabilização da temperatura. Distribuir volumes de aproximadamente 25 mL em placas de Petri previamente esterilizadas. As placas de Petri contendo o agar L podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 7 dias.

5.4.4 Agar L com ampicilina (agar La)Fórmula:

Bacto triptona.....	10,0 g
Bacto extrato de levedura.....	5,0 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	5,0 g
Bacto agar.....	15,0 g
Solução de ampicilina 10 mg/mL.....	2,0 mL
Água destilada.....	1,0 L

Preparo:

Preparar o ágar L com ampicilina de acordo com 5.4.3 e, após a estabilização da temperatura em banho-maria a 55°C, adicionar as septicamente 2,0 mL de solução de ampicilina 10 mg/mL, obtendo concentração final de 20 µg de antibiótico por mL de meio. Distribuir volumes de aproximadamente 25 mL em placas de Petri de 15 mm x 100 mm, previamente esterilizadas. As placas de Petri contendo o agar L com ampicilina podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 7 dias.

5.4.5 Agar MacConkeyFórmula:

Base agar MacConkey.....	40,0 g
Água destilada.....	1,0 L

Preparo:

Pesar a quantidade de meio desidratado indicada e acrescentar 1,0 L de água destilada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer agitando constantemente, até a completa dissolução do meio, tomando o cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após esterilização, manter o meio pre

parado em banho-maria a 55°C, para estabilização da temperatura. Distribuir assepticamente volumes de aproximadamente 25 mL em placas de Petri previamente esterilizadas. As placas que contêm o ágar MacConkey podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 7 dias.

5.4.6 Caldo de soja e triptona

Fórmula:

Triptona.....	17,0 g
Peptona de soja.....	3,0 g
Glicose.....	2,5 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	5,0 g
Fosfato de potássio dibásico (K ₂ HPO ₄).....	2,5 g
Água destilada.....	1,0 L
pH final: 7,3 ± 0,1	

Preparo:

Pesar 30 g do meio desidratado "tryptic soy broth" (caldo de soja e triptona) e acrescentar 1,0 L de água destilada fria. Aquecer agitando até a completa dissolução do meio, tomando o cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Se necessário, ajustar o pH para 7,3 ± 0,1 com solução de hidróxido de sódio 1N. Distribuir volumes de 12 a 13 mL em tubos de ensaio com tampa rosqueada. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Os tubos que contêm caldo de soja e triptona podem ser armazenados sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 30 dias.

5.5 Soluções

5.5.1 Tampão B

Fórmula:

Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄).....	16,10 g
Fosfato de sódio monobásico (NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O).....	5,50 g
Cloreto de potássio (KCl).....	0,75 g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ . 7H ₂ O)	0,25 g
"Sodium dodecyl sulfate" (SDS).....	1,00 g
β-mercaptoetanol.....	2,70 mL
Água destilada.....	1,0 L
pH final: 7,0	

Preparo:

Pesar os componentes e dissolver sob agitação lenta um de cada vez em água destilada morna. Acrescentar com cuidado o SDS para

não formar espuma. Acertar o pH para 7,0 e finalmente em uma ca
pela apropriada para manipulação de produtos químicos acrescen
tar o β -mercaptoetanol. Distribuir cuidadosamente volumes de 100
mL em frascos rosqueados. O tampão B pode ser armazenado à tem
peratura ambiente por um período máximo de 14 dias.

5.5.2 Tampão P

Fórmula:

Tris (hidroximetil) aminometano.....	121,0 g
"Sodium dodecyl sulfate (SDS).....	1,0 g
Água destilada.....	1,0 L
pH final: 8,8	

Preparo:

Pesar os componentes e dissolver um de cada vez sob agitação len
ta em água destilada morna. Acertar o pH para 8,8 com ácido clo
rídrico (HCl) e distribuir volumes de 100 mL em frascos rosquea
dos. O tampão P pode ser armazenado à temperatura ambiente por
um período máximo de 14 dias.

5.5.3 Tampão fosfato 0,1M pH 7,0

Fórmula:

Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) 0,1M (solução A).....	61 mL
Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,1M (solução B).....	39 mL
pH final: 7,0	

Preparo:

Para o preparo deste tampão proceder como segue:

1) Solução A

Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4).....	1,42 g
Água destilada.....	100,0 mL
Dissolver o fosfato de sódio dibásico em 100 mL de água des tilada fria.	

2) Solução B

Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).....	1,38 g
Água destilada.....	100,0 mL
Dissolver o fosfato de sódio monobásico em 100 mL de água des tilada fria.	

3) Juntar as soluções A e B nos volumes indicados e checar o pH.
Ajustá-lo para 7,0 (com a solução A para elevar o pH ou com
a solução B para abaixá-lo). Colocar o tampão em frasco ros

queado e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Armazenar sob refrigeração (2 a 8°C) durante um período máximo de 60 dias.

5.5.4 Solução de o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG) 4 mg/mL

Fórmula:

o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG).....	400 mg
Tampão fosfato pH 7,0.....	100 mL

Preparo:

Dissolver o ONPG a quente no tampão fosfato pH 7,0. Preparar no dia do uso e manter sob refrigeração (2 a 8°C) e no escuro até o momento de sua utilização no teste. A porção da solução que não foi utilizada deve ser descartada.

5.5.5 Solução de p-nitrofenil fosfato disódium (PNPP) 4 mg/mL

Fórmula:

p-nitrofenil fosfato disódium (PNPP).....	400 mg
Tampão P.....	100 mL

Preparo:

Dissolver o PNPP em tampão P. Preparar no dia do uso e manter sob refrigeração (2 a 8°C) e no escuro até o momento de sua utilização no teste. A porção da solução que não foi utilizada deve ser descartada.

5.5.6 Solução de NaCO₃ 1M

Fórmula:

Carbonato de sódio (NaCO ₃).....	106 g
Água destilada.....	1,0 L

Preparo:

Dissolver o carbonato de sódio em 1,0 L de água destilada morna e distribuir volumes de 100 mL em frasco rosqueado. Armazenar a temperatura ambiente por um período máximo de 14 dias.

5.5.7 Solução de HCl 2,5M

Fórmula:

Ácido clorídrico (HCl) p.a.....	206,7 mL
Água destilada.....	793,3 mL

Preparo:

Para o preparo desta solução, medir 206,7 mL de ácido clorídrico p.a. e adicioná-lo vagarosamente à água, utilizando máscara de proteção respiratória e luvas de borracha. Distribuir em fras

cos rosqueados e armazenar por um período máximo de 14 dias.

Nota: Nunca adicionar a água ao ácido, sempre o ácido à água. Colocar o recipiente de vidro em que for feita a solução de HCl em banho de gelo.

5.5.8 Tris 2M

Fórmula:

Tris (hidroximetil) aminometano.....	242,2 g
Água destilada.....	1,0 L
pH final: 7,4	

Preparo:

Pesar o tris e dissolvê-lo em água destilada fria. Distribuir vo-
lumes de 100 mL em frascos apropriados e autoclavar a 121°C por
15 minutos. Esta solução pode ser armazenada sob refrigeração (2
a 8°C) durante um período máximo de 60 dias.

5.5.9 Solução de ampicilina (10 mg/mL)

Fórmula:

Ampicilina.....	100,0 mg
Água destilada estéril.....	10,0 mL

Preparo:

Pesar a ampicilina e dissolver com água destilada estéril. Este-
rilizar por membrana filtrante 0,22 µm em tubo de ensaio rosquea-
do previamente esterilizado. A solução de ampicilina 10 mg/mL po-
de ser armazenada sob refrigeração (2 a 8°C) por 30 dias.

5.5.10 Solução de 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) 1,0 mg/mL

Fórmula:

4-nitroquinolina-1-óxido.....	1,0 mg
Dimetilsulfóxido.....	1,0 mL

Preparo:

Pesar alíquotas de 1,0 mg de 4-nitroquinolina-1-óxido diretamen-
te em ampolas de polipropileno descartáveis. Para isto deve ser
utilizada máscara de proteção respiratória para pós tóxicos, e
luvas cirúrgicas. Dissolver a 4-nitroquinolina-1-óxido em dime-
tilsulfóxido somente no dia do teste. Armazenar as ampolas com
as alíquotas pesadas em "freezer" (-20°C) até o momento do uso.

5.5.11 Solução de ácido sulfúrico/ácido nítrico H₂SO₄/HNO₃ (6:1)

Fórmula:

Solução de ácido sulfúrico 50%.....	600,0 mL
Solução de ácido nítrico 50%.....	100,0 mL

Preparo:

Esta solução deve ser preparada como segue:

- a) preparar a solução de ácido sulfúrico 50% com a seguinte com
posição

Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) p.a.....	500,0 mL
Água destilada.....	500,0 mL

Para o preparo desta solução, medir 500 mL de ácido sulfúri
co p.a. e adicioná-lo vagorosamente à água, utilizando má^{sc}
cara de proteção respiratória contra gases, e luvas de bor
racha.

- b) preparar a solução de ácido nítrico 50% com a seguinte com
posição:

Ácido nítrico (HNO ₃) p.a.....	500,0 mL
Água destilada.....	500,0 mL

Para o preparo desta solução, medir 500 mL de ácido nítrico
p.a. e adicioná-lo vagorosamente à água, utilizando máscara
de proteção respiratória contra gases, e luvas de borracha.

- c) misturar vagorosamente 6 partes de solução de ácido sulfúri
co a 1 parte de solução de ácido nítrico.

Nota: Nunca adicionar a água ao ácido, sempre o ácido à água.

5.6 Amostragem

A coleta deve ser realizada segundo NBR 9898 - "Preservação e técnicas
de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores" (ABNT) e Guia
de Coleta e Preservação de Amostras de Água" (CETESB).

5.6.1 Amostra

A amostra deve ser bem identificada e as informações sobre a mesma de
vem ser completas: nº e tipo da amostra, data, local de coleta, pH, clo
ro residual e outras informações relevantes para que os resultados pos
sam ser corretamente interpretados.

5.6.2 Preparo das amostras

5.6.2.1 Os compostos químicos podem ser testados diretamente ou dissol
vidos em solventes apropriados como, por exemplo, água destilada ou di
metilsulfóxido (DMSO). As amostras ambientais líquidas, como água bru
ta, tratada e efluentes, são normalmente submetidas a processos de con
centração e extração orgânica. Existem vários métodos de extração orgâ
nica, cada um sendo preferencial para determinados grupos de substân
cias químicas, devendo-se, portanto, escolher o método mais apropriado
para o tipo de amostra a ser analisada. Recomenda-se o uso de extração

por resinas tipo XAD₂ ou XAD₄ para água bruta e tratada e extração líquida/líquida para efluentes industriais, cujo conteúdo orgânico frequentemente é mais elevado.

5.6.2.2 O volume da amostra a ser concentrado é variável, pois vai depender do tipo de amostra e ao fim a que se destina. Normalmente, concentra-se de 5-10 litros para água bruta e de 50-100 litros para água tratada. Amostras de resíduos sólidos e sedimento podem ser extraídas com solventes apropriados ou lixiviados com água destilada. A quantidade de material coletado deve ser de 400 a 500 g e deve ser acondicionado em sacos plásticos atóxicos. Os extratos orgânicos obtidos pelos processos acima são armazenados a -20°C até o momento do uso, quando são ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO). O prazo de utilização não deve exceder 30 dias.

5.7 Organismo indicador

Linhagem de E. coli PQ 37 que apresenta o gene estrutural da β -galactosidase sob controle do operador do gene sfi A, um dos responsáveis pela filamentação bacteriana, uma das funções SOS.

Na E. coli PQ 37 a síntese de β -galactosidase só ocorre quando o gene sfi A é induzido, uma vez que o gene lac Z normal desta cepa foi deletado.

Nesta cepa a toxicidade da amostra de substância analisada pode ser avaliada através da medida da enzima fosfatase alcalina (FA) cuja produção nesta linhagem é constitutiva (mutação Pho C).

A E. coli PQ 37 possui ainda as mutações uvr A e rfa que aumentam a sua sensibilidade, a primeira por torná-la deficiente em reparo por excisão, e a segunda por permitir a entrada de substâncias químicas normalmente não difusíveis em uma célula de E. coli selvagem. Os principais marcadores genéticos da linhagem de E. coli PQ 37 são apresentados a seguir:

lac A::Mud (Ap lac) cts

lac Δ U 169

mal⁺, uvr A, gal E gal Y, Pho C, rfa

A cepa PQ 37 pode ser obtida através do Dr. Maurice Hoffnung, Unité de Programmation Moléculaire et Toxicologie Génétique, CNRS LA271, INSERM U.163 Institut Pasteur, 28 rue du Dr. Roux, 75015 Paris - FRANCE.

5.8 Manutenção e estoque da cepa de E. coli PQ 37

Nota: A cultura de E. coli PQ 37 é normalmente fornecida em tubos contendo agar La.

5.8.1 Ao receber a cultura repicá-la assepticamente para caldo La.

5.8.2 Incubar o caldo sob agitação (150 a 170 rpm) pernoite a 37°C.

5.8.3 Após o período de incubação, com o auxílio de uma alça de inoculação, estriar as culturas em placas de agar La, de forma a obter colônias isoladas. Incubar as placas invertidas a 37°C.

5.8.4 Selecionar 10 colônias isoladas e transferir uma a uma para tubos com 5 mL de caldo La. Incubar sob agitação (180 a 200 rpm) pernoite a 37°C.

5.8.5 Checar as características genéticas da cultura obtida no item anterior (5.8.4) conforme 5.9.

5.8.6 Culturas estoque permanentes

Podem ser obtidas a partir do caldo, conforme 5.8.6.1 a 5.8.6.5.

5.8.6.1 Dispensar 0,9 mL do caldo em ampolas de vidro ou plástico, previamente esterilizadas e devidamente identificadas (nº da cepa e data).

5.8.6.2 Adicionar assepticamente 0,1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotetor.

5.8.6.3 Homogeneizar e colocar as ampolas sob refrigeração (2 a 8°C) por aproximadamente 5 horas. Após este período colocá-las a -20°C.

5.8.6.4 Fazer leitura das marcas genéticas das culturas conforme item 5.9.

5.8.6.5 Transferir para "freezer" -70°C ou nitrogênio líquido (-196°C) as ampolas com cultura cujas marcas genéticas correspondem a E. coli PQ 37.

5.8.7 Culturas estoque de rotina

Podem também ser obtidas a partir do caldo conforme item 5.8.6.1 a 5.8.6.5. A quantidade de tubos com cultura estoque para rotina a ser feita dependerá do número de ensaios realizados pelo laboratório. As culturas estoque congeladas usadas na rotina podem ser renovadas a cada 6 meses.

Nota: Recomenda-se manter um controle das cepas congeladas, registrando a data de congelamento e o local de estoque, de cada cepa armazenada.

5.9 Verificação das características genéticas da cepa de E. coli PQ 37

Os testes para verificação das características genéticas da cepa de E. coli PQ 37 devem ser realizados com as culturas originais recebidas do Instituto Pasteur e a cada renovação de culturas estoque para uso na rotina.

5.9.1 Presença de mutação rfa

O caráter rfa da cepa é confirmado através da sensibilidade ao desoxi colato.

5.9.1.1 Semear a cultura crescida em caldo La (pernoite) em estria única, com o auxílio de uma alça de inoculação, em placa de agar La (controle) e, a seguir, em placa de agar MacConkey. Cinco a seis culturas podem ser testadas em uma mesma placa. A identificação de cada cultura testada deve ser feita no local da estria, no fundo da placa de Petri.

5.9.1.2 Incubar as placas invertidas a 37°C (pernoite) e verificar a presença de crescimento.

5.9.1.3 A E. coli PQ 37 não deverá crescer em agar MacConkey e crescerá na placa controle, agar La.

5.9.2 Presença de mutação uvr A

A mutação uvr A pode ser confirmada, verificando-se a sensibilidade a UV.

5.9.2.1 Semear a cultura em caldo La (pernoite), na superfície de uma placa de agar La, em estrias paralelas.

5.9.2.2 Retirar a tampa da placa, cobrir metade com cartolina. Irradiar a placa com lâmpada germicida de 15W a uma distância de 33 cm.

5.9.2.3 Incubar as placas invertidas a 37°C por 24 horas e verificar a presença de crescimento.

5.9.2.4 As cepas com mutação uvr A crescerão somente na metade da placa não irradiada.

5.9.3 Síntese constitutiva de fosfatase alcalina (mutação Pho C)

A síntese constitutiva de fosfatase alcalina pode ser determinada através de reação enzimática.

5.9.3.1 Repicar as colônias isoladas obtidas em 5.8.3 com auxílio de palitos estéreis uma a uma para placa de agar L (ver Figura 1). Identificar cada colônia marcando o número correspondente a cada uma delas no fundo da placa de Petri.

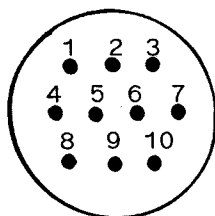


FIGURA 1 - Placa com colônias isoladas para testar fosfatase alcalina

5.9.3.2 Incubar a placa invertida a 37°C por 24 horas.

5.9.3.3 Transferir as colônias isoladas com auxílio de palitos estéreis para papel de filtro previamente impregnado com solução de p-nitrofenil fosfato disodiuim (PNPP) em tampão P.

5.9.3.4 A presença de fosfatase alcalina pode ser detectada através de cor amarela desenvolvida em alguns segundos no papel de filtro impregnado em PNPP.

5.9.4 Resistência à ampicilina

A resistência à ampicilina pode ser verificada através de crescimento em meio contendo este antibiótico.

5.9.4.1 Estriar com auxílio de alça de inoculação a cultura do caldo La (pernoite) em placa de agar La. Pode-se estriar 5 a 6 culturas em uma mesma placa.

5.9.4.2 Incubar as placas invertidas a 37°C por 24 horas e verificar a ocorrência de crescimento.

5.10 Preparo da cultura de E. coli PQ 37 utilizada no ensaio

5.10.1 Descongelar uma das ampolas com cultura de E. coli PQ 37 para uso em rotina à temperatura ambiente.

5.10.2 Inocular o conteúdo da ampola assim que ocorrer o degêlo em 30 mL de caldo La.

5.10.3 Incubar a 37°C sob agitação (150 a 170 rpm) pernoite.

5.10.4 Diluir a cultura pernoite 1:50 em caldo L (0,6 mL de cultura pernoite em 29,4 mL de caldo L).

5.10.5 Incubar a 37°C sob agitação (150 a 170 rpm) por 2 a 3 horas e/ou atingir $DO_{550nm} = 0,2$ correspondendo a 2×10^8 células/mL (fase exponencial).

5.11 Controles negativos

O controle negativo consiste no solvente utilizado para dissolução do produto químico ou amostra em teste. Utilizar o volume equivalente ao maior volume da amostra testada.

5.12 Controles positivos

Todo ensaio deve ser realizado incluindo controles positivos para confirmar as propriedades de indução da fusão sfi A::lac Z. Recomenda-se o uso de substâncias padrão descritas na Tabela 1, podendo-se empregar outros controles, desde que em concentrações adequadas.

TABELA 1 - Controles positivos para o CROMOTESTE

Ensaio	Composto	Solvente	Dose (µg/tubo)
Sem ativação (-S9)	4NQO	DMSO	5 a 20

Nota: a) 4NQO: 4-nitroquinolina-1-óxido
b) DMSO: dimetilsulfóxido

5.13 Procedimento do ensaio

5.13.1 Exposição da cultura de E. coli PQ 37 a amostra ou substância química em teste

5.13.1.1 Marcar os tubos a serem utilizados na incubação da cepa com a amostra (tubos para ensaio da β -galactosidase e para o ensaio da fosfatase alcalina).

5.13.1.2 Diluir a cultura em fase exponencial obtida no item 5.10.5 a 1:10 em caldo L.

Nota: Nesta etapa usar volumes de diluente suficientes para o teste programado, lembrando que são necessários 600 µL de cultura diluída para cada tubo utilizado no teste.

5.13.1.3 Distribuir 20 µL das diferentes doses de cada amostra, controle negativo, e controle positivo em tubos de ensaio de 14 mm x 100 mm.

5.13.1.4 Adicionar 600 µL da cultura obtida a cada tubo e incubar por 2 horas sob agitação (200 rpm) a 37°C.

5.13.1.5 Após o período de incubação, dividir igualmente o conteúdo de cada tubo para realização dos ensaios de β -galactosidase e fosfatase alcalina, sendo 310 µL para cada ensaio.

5.13.2 Ensaio para β -galactosidase (β -Gal)

5.13.2.1 Estabilizar os frascos contendo solução de tampão B a ser utilizadas no teste a 37°C.

5.13.2.2 Adicionar 2,7 mL de tampão B à alíquota de 310 µL de cultura tratada, separada previamente para o ensaio da β -Gal.

5.13.2.3 Incubar os tubos na estufa à temperatura de 37°C por 10 minutos.

5.13.2.4 Retirar os tubos da estufa e adicionar 600 μ L de solução de ONPG 4 mg/mL a cada tubo.

Nota: Adicionar a solução de ONPG rapidamente e de forma a manter o mesmo intervalo de tempo na adição do substrato a cada tubo.

5.13.2.5 Incubar os tubos na estufa a 37°C e verificar o desenvolvimento de cor amarela.

Nota: A contagem de tempo do ensaio é iniciada a partir do momento em que se coloca os tubos à 37°C. Anotar o tempo necessário para o aparecimento de cor amarela de forma que a absorbância final seja de 0,1-0,4 em DO_{420} . O intervalo de tempo para desenvolvimento de cor pode ser diferente para cada um dos controles utilizados e para as amostras em teste.

5.13.2.6 Após o desenvolvimento de cor amarela, paralisar a reação adicionando-se 2 mL de solução de Na_2CO_3 1M a cada tubo.

Nota: A adição de Na_2CO_3 1M permite que a cor fique estável por algumas horas.

5.13.2.7 Ler a absorbância a 420 nm (A_{420}) para cada tubo, zerando previamente o espectrofotômetro com o branco de leitura para o ensaio de β -Gal.

Nota: O branco utilizado para zerar o espectrofotômetro para leitura do ensaio de β -Gal é obtido adicionando-se todas as soluções empregadas neste ensaio e substituindo-se a cultura tratada por caldo L.

5.13.3 Ensaio para fosfatase alcalina (FA)

5.13.3.1 Estabilizar os frascos contendo solução de tampão P a ser utilizada no teste a 37°C.

5.13.3.2 Adicionar 2,7 mL de tampão P à alíquota de 310 μ L de cultura tratada, separada previamente para o ensaio da FA.

5.13.3.3 Estabilizar os tubos à temperatura de 37°C por 10 minutos.

5.13.3.4 Retirar os tubos da estufa e adicionar 600 μ L de solução de PNPP 4 mg/mL a cada tubo.

Nota: Adicionar a solução de PNPP rapidamente e de forma a manter o mesmo intervalo de tempo na adição do substrato a cada tubo.

5.13.3.5 Incubar os tubos na estufa a 37°C e verificar o desenvolvimento de cor amarela.

Nota: A contagem de tempo é feita da mesma maneira e tomando-se os mesmos cuidados citados no ensaio da β -Gal.

5.13.3.6 Após o desenvolvimento de cor amarela, paralisar a reação adicionando-se 1 mL de HCl a 2,5M.

Nota: A alteração do pH para ácido faz com que a cor amarela desapareça e a mistura ficará transparente.

5.13.3.7 Para fazer a leitura, adicionar 1 mL de Tris 2M, restaurando assim a cor amarela original (pH básico).

5.13.3.8 Ler a absorbância à 420 nm (A_{420}) para cada tubo, zerando previamente o espectrofotômetro com o branco de leitura para o ensaio da fosfatase alcalina.

Nota: O branco utilizado para zerar o espectrofotômetro para leitura do ensaio da FA é obtido adicionando-se a um tubo de 14 mm x 100 mm todas as soluções empregadas neste ensaio e substituindo-se a cultura tratada por caldo L.

6 RESULTADOS

6.1 Expressão dos resultados

6.1.1 Calcular as unidades enzimáticas (UE) de β -Gal e FA para cada tubo segundo a fórmula abaixo (Miller, 1972).

$$UE = \frac{1\ 000 \times A_{420}}{\Delta t}$$

onde:

A_{420} = valor de absorbância obtido a 420 nm

Δt = tempo necessário para aparecimento de cor após adição do substrato (ONPG no ensaio da β -Gal e PNPP no ensaio da FA incubação a 37°C)

6.1.2 Calcular a razão (R) entre as duas unidades enzimáticas obtidas.

$$R = \frac{UE\ \beta\text{-Gal}}{UE\ FA} = \frac{A_{420}\beta\text{-Gal} \times \Delta t\ FA}{A_{420}\ FA \times \Delta t\ \beta\text{-Gal}}$$

6.1.3 A seguir é calculado o fator de indução (FI) que permite comparar resultados obtidos em diferentes experimentos.

$$FI = \frac{R\ (Cn)}{R\ (Co)}$$

onde:

R (Cn) = razão de cada concentração da substância ou amostra em teste

R (Co) = razão na concentração zero (controle negativo)

6.1.4 A potência da amostra ou composto químico frente ao Cromoteste costuma ser expressa através do SOSIP ("SOS - inducing potency"), que equivale ao FI avaliado por unidade de massa ou volume do composto analisado. O valor do SOSIP pode ser facilmente obtido pela inclinação da porção retilínea da curva dose-resposta.

6.2 Interpretação dos resultados

6.2.1 Amostra positiva

Resultados positivos no Cromoteste, indicam que a substância ou amostra em teste é capaz de causar lesão no ADN da E. coli PQ 37 induzindo o sistema de reparo SOS.

6.2.1.1 Um resultado é considerado positivo quando existe uma relação dose-resposta significativa entre as concentrações da amostra testada e o fator de indução (FI).

6.2.2 Amostra negativa

Resultados negativos no Cromoteste, indicam que nas condições do ensaio, a substância ou amostra testada não apresenta atividade genotóxica para a E. coli PQ 37.

6.2.2.1 Considera-se resultado negativo quando não é observada relação dose-resposta significativa entre as concentrações do composto testadas e o fator de indução.

7 LAUDO TÉCNICO

O laudo técnico referente ao ensaio deve incluir as seguintes informações:

- a) cepa bacteriana empregada;
- b) concentrações empregadas da substância ou amostra testada;
- c) apresentação dos resultados obtidos com os controles positivos e negativos utilizados;
- d) curva dose-resposta;
- e) descrição dos resultados;
- f) interpretação dos resultados.

8 RECOMENDAÇÕES

8.1 Cuidados especiais devem ser tomados com relação à padronização da metodologia, verificação das características genéticas da cepa empregada, bem como o controle de qualidade dos reagentes, meios de cultura e vidraria utilizada no ensaio, a fim de assegurar a confiabilidade

de dos resultados.

/ANEXO A

REVOGADA

REVOGADA

ANEXO A - PROCEDIMENTOS COMPLEMENTARESA-1 Ensaaios de controleA-1.1 Teste de esterilidade

Após terem sido preparados, e antes de serem usados, quaisquer soluções esterilizadas ou meios de cultura são rotineiramente testados, quanto à presença de fungos e/ou bactérias. Este teste consiste na inoculação de 1 mL de cada frasco da solução em teste em 2 tubos de caldo de soja e triptona (ver 5.4.6), os quais, após sementeira, são incubados a 37°C durante, no mínimo, 48 horas (deve-se efetuar leituras diárias até completar 14 dias). Constitui evidência da presença de microrganismos qualquer turvação do caldo de soja e triptona. Essa contaminação pode ser decorrente de falhas no processo de esterilização ou contaminação após a esterilização.

A-1.2 Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia (ver Norma CETESB M1.001)A-1.3 Lavagem do material utilizado no Cromoteste

Todos os materiais utilizados no teste, tais como: frascos de coleta, placas de Petri de vidro, tubos de ensaio, pipetas e ponteiras, devem ser descontaminados em autoclave a 121°C por 30 minutos e, a seguir, lavados com detergente neutro e enxaguado várias vezes. Após enxágue, devem ficar submersos em solução de ácido sulfúrico/ácido nítrico 50% (6:1) por 8 horas. Enxaguar 8 a 10 vezes com água corrente e uma vez com água destilada. Secar o material de vidro em estufa a 170-180°C e as ponteiras de polipropileno em estufa a 35°C. Não utilizar solução sulfocrômica na lavagem de material para teste de Ames.

Nota: Utilizar, de preferência, placas de Petri descartáveis.

A-1.4 Controle de qualidade dos meios de cultura (ver Norma CETESB L5.216)A-1.5 Controle da qualidade da água destilada

A água destilada a ser empregada no preparo de meios de cultura e soluções deve ser de alta qualidade, livre de substâncias tóxicas ou nutritivas que possam influenciar na sobrevivência e crescimento dos microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade, através de testes específicos (ver Norma CETESB L5.215 - "Prova de adequabilidade da água destilada para fins microbiológicos").

A-1.6 Controle de eficiência da autoclave

Utilizar ampolas com suspensão de esporos de Bacillus stearothermophilus

em meio de cultura, colocando-as no centro da caixa que contém os meios de cultura a serem esterilizados. Essas ampolas, depois da autoclavação, são incubadas em banho-maria a 55°C durante 24 a 48 horas. Se houver mudança da coloração da suspensão contida nas ampolas, de roxa para amarela, isto significa que a esterilização foi insuficiente, pois houve desenvolvimento de bactérias.

A-1.7 Controle de esterilidade de vidraria e materiais

É recomendável a realização de testes específicos para avaliar e comprovar a esterilidade de vidraria e materiais submetidos a esterilização em estufa, a 170-180°C, ou em autoclave a 121°C. Para realização desses testes ver Norma CETESB L5.010 - "Avaliação de laboratório de análise microbiológica de água".

A-2 Local de trabalho

A-2.1 As câmaras de segurança biológica devem estar localizadas em áreas de movimento reduzido, livres de poeira; não deve haver movimentação excessiva de ar devido ao uso de ventiladores, exaustores, etc.

A-2.2 Se a lâmina estiver instalada em local com ar condicionado, a entrada de ar não deve ser dirigida diretamente sobre a área de trabalho, a não ser que o condicionador tenha um filtro de ar especial.

A-2.3 A câmara deve ter um duto de exaustão com filtros apropriados para filtrar o ar antes de ser liberado para o ambiente externo.

A-3 Precauções

Dentre as pessoas que trabalham no laboratório, aquelas que têm menor tempo de treinamento e as que estão diretamente associadas a manobras com material contaminado são as que apresentam maiores possibilidades de serem contaminadas acidentalmente. A inalação de aerossóis, a aspiração de soluções contaminadas através de pipetas e outros acidentes devem ser prevenidos pelo uso de protetores faciais adequados, pipetadores e pela obediência às normas específicas relativas ao trabalho e uso de equipamento (ver Norma CETESB L5.009 - "Segurança e higiene do trabalho em laboratório de microbiologia").

A-3.1 Protetor facial e máscaras de proteção contra gases e pós-tóxicos
De utilização obrigatória (juntamente com luvas adequadas) no preparo de soluções de ácidos a serem empregadas na lavagem de materiais, no preparo de soluções de compostos genotóxicos e na manipulação de solventes.

A-4 Cuidados na manipulação da cepa de *E. coli* PQ 37

A-4.1 Como precaução rotineira, deve-se autoclavar qualquer material contaminado, antes da lavagem ou descarte dos mesmos. Não se deve permitir manter nenhum tipo de alimento no interior dos refrigeradores, onde as cepas são armazenadas.

Nota: Nos ensaios enzimáticos de β -Gal e FA ocorre morte do microrganismo pela permeabilização da parede celular com detergente SDS.

A-5 Disposição de material contaminado por substâncias genotóxicas

Todo material genotóxico e/ou cancerígeno deve ser acondicionado em vasilhames plásticos adequados, selados em sacos plásticos duplos e incinerados a temperatura elevada, o suficiente para que ocorra a destruição do agente genotóxico. O mesmo procedimento deve ser efetuado para luvas, ponteiras, filtros e placas de Petri descartáveis utilizadas como controle positivo. Os materiais de vidro não podem ser incinerados; devem ser acondicionados adequadamente e dispostos em aterro para resíduos perigosos. Os materiais bem como as soluções podem também ser descontaminadas através de neutralização por agentes químicos.

/ANEXO B

ANEXO B - ESQUEMAS

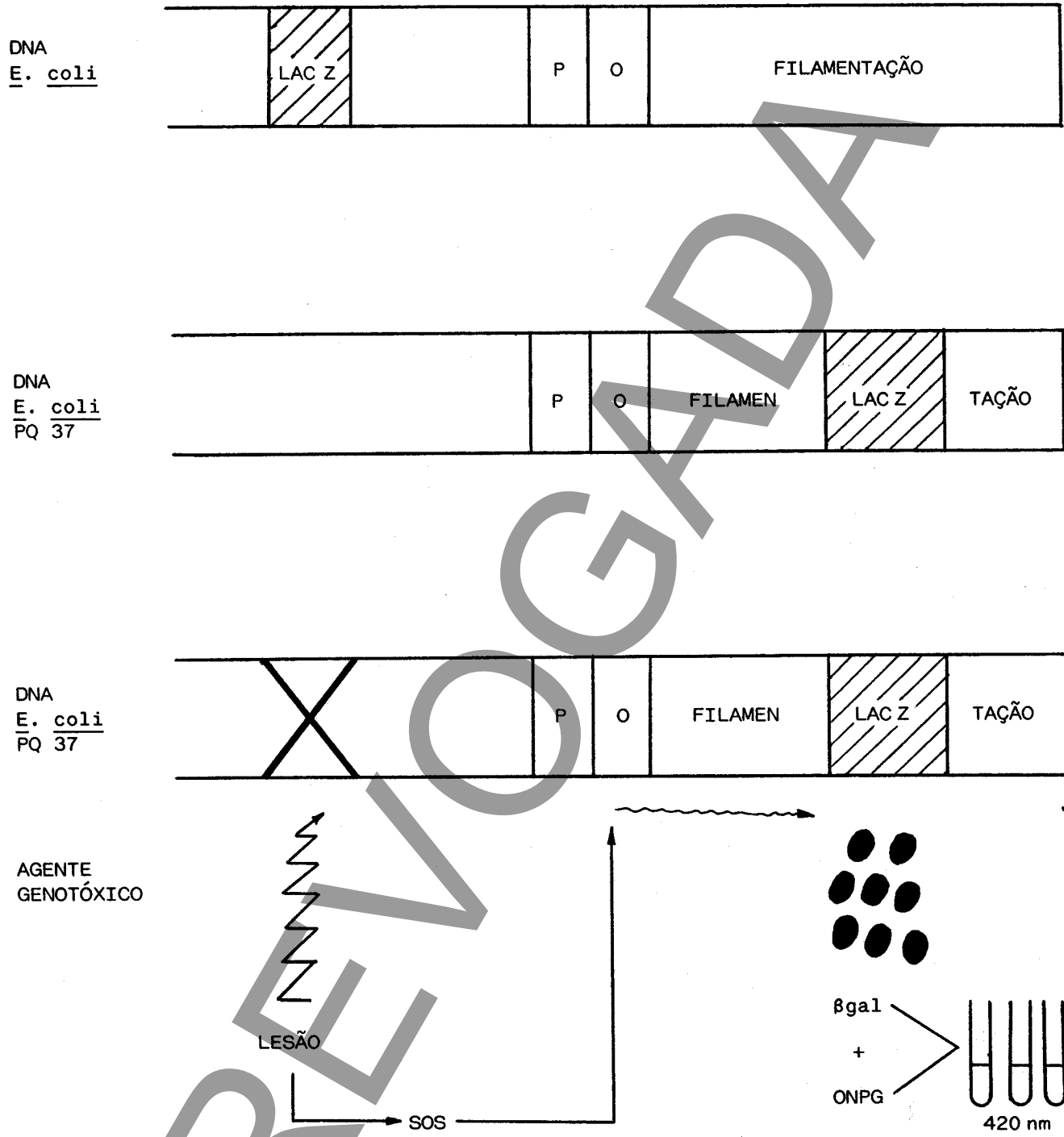


FIGURA 2 - Esquema simplificado do princípio do Cromoteste

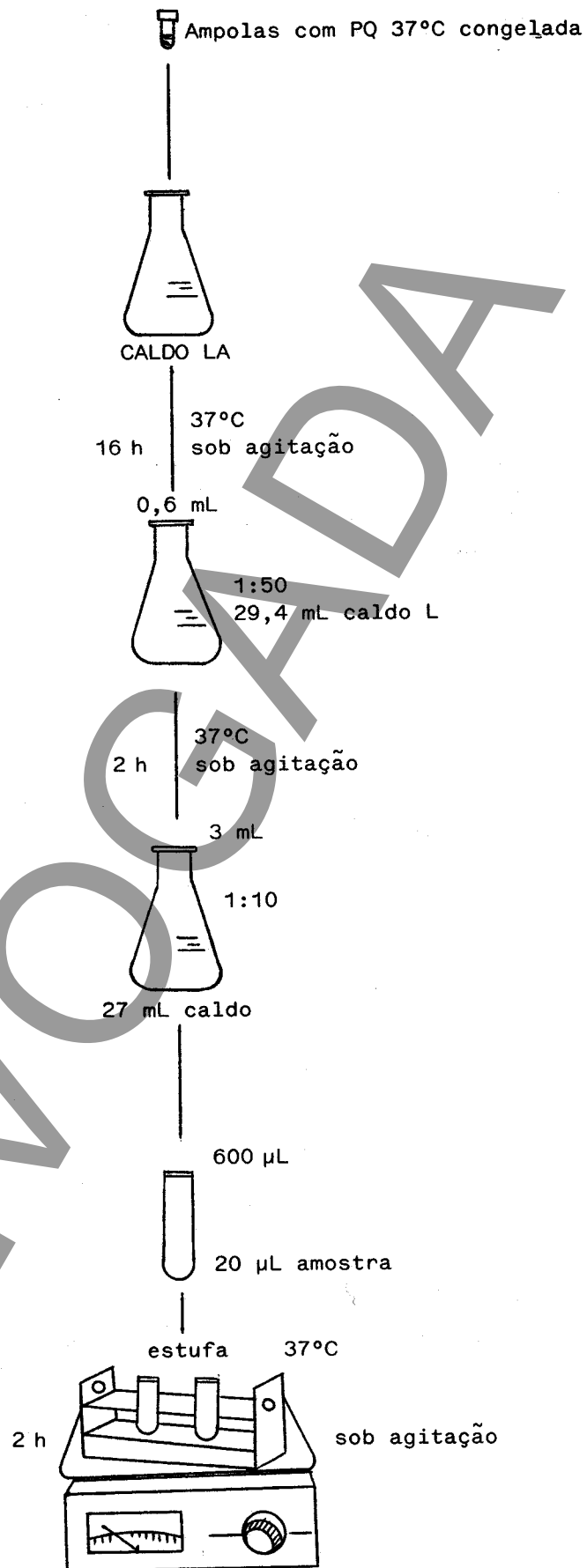


FIGURA 3 - Preparo da cepa e tratamento da amostra

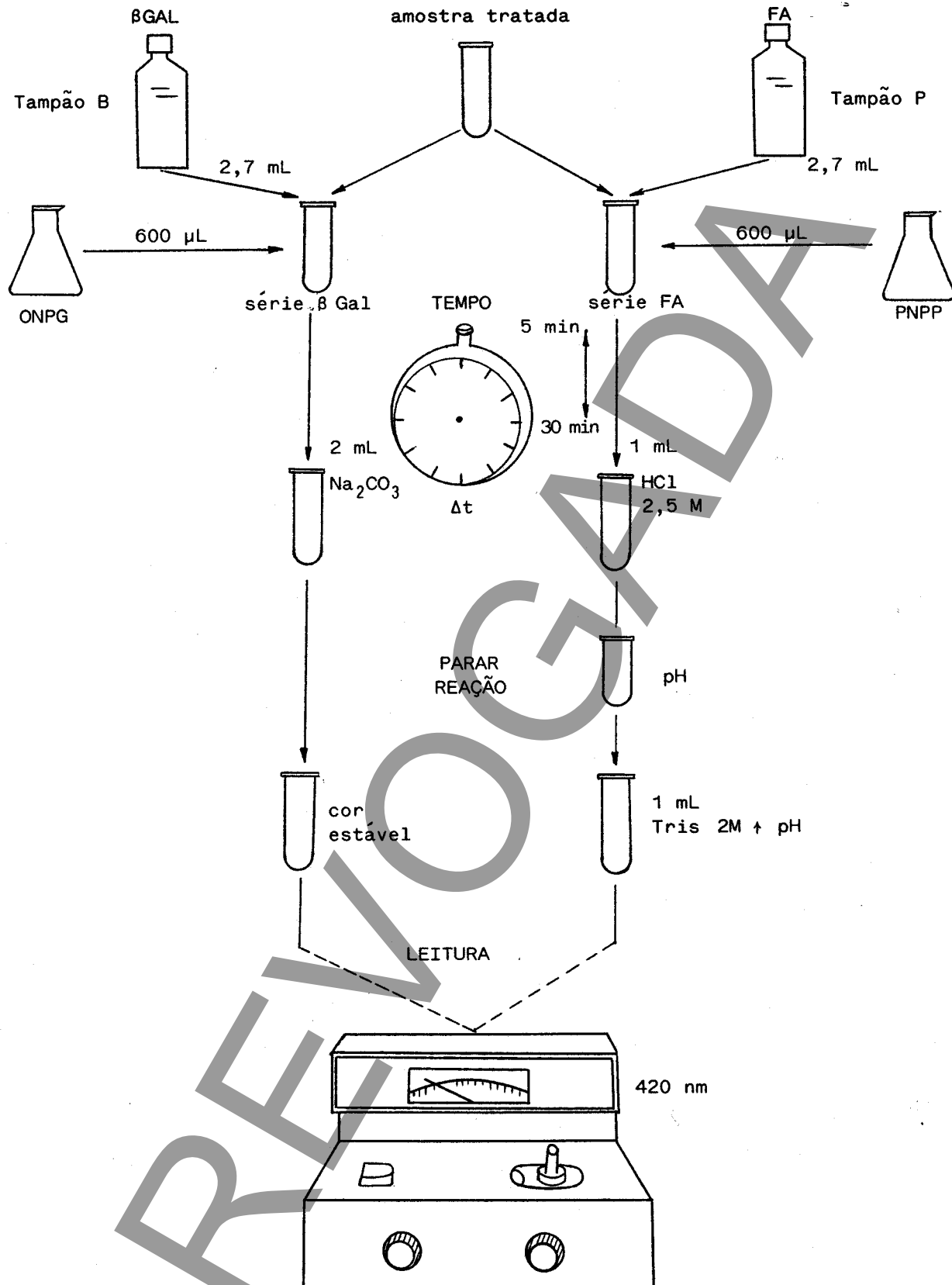


FIGURA 4 - Ensaio enzimático

ANEXO C - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- C-1 ABNT - Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. NBR 9898. Brasil, 1987.
- C-2 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination of water. In: Standard methods for the examination of water and waste water. 16ª ed. Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1985. p. 827-1028.
- C-3 ASTM - Standard method for detection of bacterial mutagens in water and formed deposit. In: Annual Book of ASTM Standards part 31, 1980.
- C-4 BRUSICK, D.J. & YOUNG, R.R. - IERL-RTP Procedures Manual: Level 1 Environmental assessment biological tests. Washington, U.S. EPA, 1981, p. 138 (EPA 600/8-81-024).
- C-5 BRUSICK, D.J.; YOUNG, R.R.; MYHR, B.C. & JAGANNATH, D.R. Quality Control and Quality Assurance procedures for level 1 health effects bioassays. Washington, U.S. EPA 1983 p. 13-25 (EPA 600/8-83-034).
- C-6 CETESB - Avaliação de laboratórios de análises microbiológicas de água. Norma CETESB L5.010, São Paulo, 1979.
- C-7 CETESB - Controle de qualidade de meios de cultura. Norma CETESB L5.216, São Paulo, 1979.
- C-8 CETESB - Lavagem, preparo e esterilização de materiais de laboratório de microbiologia. Norma CETESB M1.001, São Paulo, 1986.
- C-9 CETESB - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. Norma CETESB L5.215, São Paulo, 1985.
- C-10 CETESB - Segurança e higiene do trabalho em laboratórios de microbiologia ambiental. Norma CETESB L5.009, São Paulo, 1987.
- C-11 COSTA, S.O.P. Genética Molecular e de Microrganismos, São Paulo, Editora Manole Ltda., 1987 p. 559.
- C-12 DUTKA, B.J. Concentration procedures for liquid samples for mutagen testing. Canadá, Feb. 1980 (ISO/TC147/SC5/WG7).
- C-13 EPA. Manual of analytical methods for the analysis of pesticides in humans and environmental samples. Washington, U.S. EPA, 1980 (EPA-600/8-80-038).
- C-14 FISH, F.; LAMPERT, I.; HALACHMI, A.; RIESENFELD, G. & HERZERBERG, M. Organics Ltd., P.O. Box 360, Yavne 70650, Israel. The SOS chromotest kit: A rapid method for the detection of genotoxicity Toxicity Assessment, 2, 1987.

- C-15 GOMES, R.A. Testes baseados na indução das funções SOS. In: Muta gênese, terarogênese e carcinogênese. Métodos e critérios de ava liação. Edit. Rabello - Gay, M.N.; Rodrigues, M.A.R. & Monteleone Neto, R. Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 246 p, 1991.
- C-16 _____. Guia de coleta e preservação de amostras de água, CETESB, São Paulo, 1988.
- C-17 JOICE, R.M. Prudent practices for disposal of chemicals from laboratories. Science, 224: 449-452, 1984.
- C-18 HEALTH AND WELFARE. Guidelines on the use of mutagenicity tests in the toxicological evaluation of chemicals. Ottawa, Canada, 1986.
- C-19 LÉONARD, A. Stratégie et interpretation des tests à court terme. Ann. Biol. Clin., 44: 662-664, 1986.
- C-20 LITTLE, J.W. & MOUNT, D.W. The SOS regulatory system of Escherichia coli, Cell, 29: 11-22, 1982.
- C-21 MARON, D.M. & AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella muta genicity test. Mutat. Res., 113: 173-215, 1983.
- C-22 MHU & SEMA. Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília, 1ª ed., 1988.
- C-23 PELCZAR, M.; REID, R. & CHAN, E.C. Microbiologia. São Paulo, McGraw-Hill, v. 1, 1980, p. 574.
- C-24 QUILLARDET, P.; HUISMAN, O.; D'ARI, R. & HOFFNUNG, M. SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity. Proc.Natl.Acad. Sci, 79: 5971-5975, 1982.
- C-25 QUILLARDET, P. & HOFNUNG M. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. Mutat. Res., 147: 65-78, 1985.
- c-26 QUILLARDET, P. & HOFNUNG, M. The screening, diagnosis and evaluation of genotoxic agents with batteries of bacterial tests. Mutat. Res., 205: 107-118, 1988.
- C-27 WALKER, G.C. Mutagenesis and inducible responses to deosyribonucleic acid damage in Escherichia coli. Microbiological Reviews, 48 (1): 60-93, 1984.
- C-28 WHO. Long term and short-term screening assays for carcinogens: a critical appraisal. Lyon, IARC, WHO, supplement, 2, 1980, p.426.