



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS MACAÉ
CURSO DE FARMÁCIA



Thienne Fernandes Sampaio

IMPLANTAÇÃO E VALIDAÇÃO DO TESTE DE AMES NA UFRJ-MACAÉ
UTILIZANDO O MÉTODO DE MICROSSUSPENSÃO (TESTE DE KADO)

Macaé

2015

Thienne Fernandes Sampaio

IMPLANTAÇÃO E VALIDAÇÃO DO TESTE DE AMES NA UFRJ-MACAÉ
UTILIZANDO O MÉTODO DE MICROSSUSPENSÃO (TESTE DE KADO)

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como um dos requisitos para obtenção do título de Farmacêutico.

Orientadora: Profa. Dra. Samantha Monteiro Martins

Macaé

2015

Thienne Fernandes Sampaio

**IMPLANTAÇÃO E VALIDAÇÃO DO TESTE DE AMES NA UFRJ-MACAÉ
UTILIZANDO O MÉTODO DE MICROSSUSPENSÃO (TESTE DE KADO)**

COMISSÃO EXAMINADORA

Nota conferida: _____

Professora Denise Oliveira Guimarães

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Professor José Nepomuceno

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Professora Samantha Monteiro Martins

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Macaé

2015

À minha mãe, alicerce da minha vida, suporte
Indiscutível de toda minha trajetória acadêmica
E certeza de uma companhia e
Um porto seguro para toda vida.

Agradecimentos

Agradeço à Deus pela proteção a mim oferecida, por me manter forte e em pé para suportar tamanha jornada.

À minha orientadora por ser uma verdadeira *mãe acadêmica*, me dando forças, me encorajando, indo à luta junto a mim, me aconselhando e me suportando durante todo esse tempo com todos os meus defeitos e desesperos. Por sempre saber o que dizer pra me acalmar e me ensinar a solucionar problemas, sejam eles os mais complicados que fossem.

À minha família por me dar o suporte e condições necessárias para enfrentar e finalizar essa etapa, além de todo amor e carinho a mim dedicados.

Aos meus amigos mais que queridos, e maravilhosos, Vitor, Thaís, Livia e Desirée pelo apoio, pelas críticas e puxões de orelha e pelos milhões de incentivos. Pelos conselhos, por se interessarem e entrarem de cabeça nessa comigo. Agradeço ao tempo precioso de vocês, que usaram para se dedicar a mim e me ajudar quando mais precisei, sem o qual eu não conseguiria chegar nem na metade.

Ao meu namorado Vinícius, um verdadeiro guerreiro que passou mais de 3 anos ouvindo falar de bactéria, contaminação e contagem de colônias sem nem ao menos fazer ideia do que isso significava e mesmo assim esteve ao meu lado me apoiando e me aturando nos momentos de crise.

Aos professores Michelle Muzitano e Thiago Barth pela atenção oferecida, pelas palavras amigas, pelos conselhos e dicas, e pela preocupação que demonstraram com minha integridade física e mental. Por se ocuparem dos meus trabalhos sem estar ligados diretamente ao projeto, sempre aptos a resolverem meus problemas quando estes não eram da minha alçada.

Ao grupo do LPBio pelo apoio, principalmente aos companheiros, Marlon, Marcos e Rafael por literalmente segurarem a barra comigo no dia-a-dia do laboratório e por não gritarem comigo quando eu mesmo o fazia nos momentos de crise e estresse.

Resumo

Com o propósito de garantir a segurança de substâncias com fins terapêuticos a ANVISA preconiza que sejam feitos testes para avaliar o potencial genotóxico das mesmas. Sem estes testes, novos medicamentos não podem ser registrados no país. O Teste de Ames emprega cepas de *Salmonella typhimurium* que apresentam mutações em vários genes que codificam a enzima responsável pela síntese de histidina, tornando-as dependente desse nutriente. Contudo, na presença de um mutágeno, a mutação que causa dependência de histidina pode ser revertida. A interpretação dos resultados é baseada no número de colônias revertentes após exposição ao mutágeno. Além disso, um sistema de metabolização é incorporado ao teste permitindo a avaliação de substâncias que necessitam de metabolização para exercer seus efeitos. O objetivo deste trabalho foi implantar e validar o Teste de Ames, na UFRJ-Macaé, utilizando a metodologia de microssuspensão (Teste de Kado), incluindo a avaliação do potencial mutagênico de duas chalconas sintéticas (4-dimetilamino-chalcona e 3,4-(metilenodioxy)-chalcona) que apresentam atividades antimicrobacteriana e anti-inflamatória. A confecção dos estoques de células, a checagem do genótipo e a validação do Teste de Kado foi feitas de acordo com protocolos descritos na literatura. Uma possível toxicidade das chalconas frente às linhagens TA98 e TA100 foi avaliada por metodologia similar à de antibiogramas. O procedimento de checagem do genótipo demonstrou que após o repique, crescimento e confecção dos estoques de TA 98 e TA 100, as mesmas ainda apresentavam auxotrofia para histidina, permeabilidade ao cristal violeta, dependência de biotina e resistência a ampicilina. Quanto a validação do Teste de Kado, para as duas linhagens estudadas, o índice de mutagenicidade mostrou valor ≥ 2 em várias doses testadas, confirmando a genotoxicidade das amostras utilizadas na validação do ensaio. A princípio, as chalconas 4 e 5 não se mostraram tóxicas para as linhagens no ensaio de disco difusão. Contudo, no Teste de Kado, estas chalconas apresentaram toxicidade para a linhagem TA98 na ausência e na presença do sistema de metabolização, não permitindo a observação de um possível efeito genotóxico. O ensaio com a TA100 sugere que, na presença do sistema de metabolização, as chalconas 4 e 5 não apresentam um efeito mutagênico (índice de mutagenicidade < 2), o que deverá ser comprovado futuramente no ensaio com outras linhagens testadoras de *Salmonella typhimurium*.

LISTA DE ESQUEMAS

<i>Esquema 1: Mutação pontual X Mutação por deslocamento do quadro de leitura na região codificadora de um gene.....</i>	<i>17</i>
<i>Esquema 2: Representação da incorporação permanente de uma mutação durante o ciclo de replicação celular.....</i>	<i>18</i>
<i>Esquema 3: Representação básica do Teste de Ames.....</i>	<i>22</i>
<i>Esquema 4: Representação do ensaio de verificação das características genéticas (provas genéticas) das linhagens TA98 e TA100.....</i>	<i>42</i>
<i>Esquema 5: Representação do Teste de Kado.....</i>	<i>44</i>
<i>Esquema 6: Representação do ensaio de viabilidade.....</i>	<i>47</i>

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Estrutura geral das chalconas, destacando a ligação α,β-insaturada</i>	27
<i>Figura 2: Estruturas moleculares da 4-dimetilamino-chalcona (A) e 3,4-(metilenodioxo)-chalcona (B)</i>	28
<i>Figura 3: Avaliação da auxotrofia para histidina nas linhagens TA98 e TA100</i>	50
<i>Figura 4: Avaliação da manutenção da mutação rfa nas linhagens TA98 e TA100</i>	51
<i>Figura 5: Avaliação da mutação uvrB nas linhagens TA98 e TA100</i>	52
<i>Figura 6: Avaliação da presença do plasmídeo pKM101 nas linhagens TA98 e TA100</i>	54
<i>Figura 7: Avaliação da toxicidade da chalcona 4 frente a linhagem TA98 de Salmonella typhimurium.</i>	62
<i>Figura 8: Avaliação da toxicidade da chalcona 5 frente a linhagem TA98 de Salmonella typhimurium</i>	62
<i>Figura 9: Avaliação da toxicidade da chalcona 4 frente a linhagem TA100 de Salmonella typhimurium.</i>	63
<i>Figura 10: Avaliação da toxicidade da chalcona 5 frente a linhagem TA100 de Salmonella typhimurium.</i>	63

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Valores de concentração mínima inibitória das chalconas 4 e 5.</i>	28
<i>Tabela 2: Reagentes utilizados no preparo da mistura S9</i>	35
<i>Tabela 3: Substâncias utilizadas na validação do Teste de Kado na ausência (-S9) e presença (+S9) do sistema de metabolização</i>	37
<i>Tabela 4: Concentrações das chalconas e respectivas doses investigadas no teste de Kado</i>	38
<i>Tabela 5: Limites esperados de reversão espontânea das linhagens TA98 e TA100</i>	46
<i>Tabela 6: Compilação dos resultados das provas genéticas das linhagens TA98 e TA100.</i>	55
<i>Tabela 7: Validação do Teste de Kado para a linhagem TA98.</i>	56
<i>Tabela 8: Validação do Teste de Kado para a linhagem TA100.</i>	59
<i>Tabela 10: Avaliação do potencial mutagênico da chalcona 4 na linhagem TA98</i>	64
<i>Tabela 11: Avaliação do potencial mutagênico da chalcona 5 na linhagem TA98</i>	66
<i>Tabela 12: Avaliação do potencial mutagênico da chalcona 4 na linhagem TA100</i>	67
<i>Tabela 13: Avaliação do potencial mutagênico da chalcona 5 na linhagem TA100</i>	67

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

2AA – 2 Amino-Antraceno

2NF – 2 Nitro-Fluoreno

A - Adenina

ADN- Ácido desoxirribonucleico

AM – Ágar Mínimo

AN – Ágar Nutriente

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AZS – Azida sódica

C4 – Chalcona 4 (4-dimetilamino-chalcona)

C5 – Chalcona 5 (3,4-(metilenodioxy)-chalcona)

C - Citosina

CV- Cristal Violeta

DMSO – Dimetilsulfóxido

EROs- Espécies reativas de oxigênio

G - Guanina

S9 – Sistema de metabolização S9

Sal VB – Sal de Vogel-Bonner

(+S9) – presença do sistema de metabolização

(-S9) – ausência do sistema de metabolização

RM – Razão de mutagenicidade

T - Timina

UFC – Unidades formadoras de colônias

CMI – Concentração mínima inibitória

SUMÁRIO

1	<i>Introdução</i>	15
1.1	Mutabilidade do ADN	15
1.2	Mutagênese e Carcinogênese	19
1.3	O Teste de Ames	21
1.4	Método de microsuspenção (Teste de Kado)	25
1.5	Chalconas	26
2	<i>Justificativa</i>	29
3	<i>Objetivos</i>	30
3.1	Objetivos gerais	30
3.2	Objetivos Específicos	30
4	<i>Material e métodos</i>	30
4.1	Material	30
4.1.1	Equipamentos	30
4.1.2	Soluções e meios específicos	31
4.2	Métodos	38
4.2.1	Manutenção e estoque das linhagens	38
4.2.2	Verificação das características genéticas	40
4.2.3	Validação do Teste de Kado	42
4.2.3.3	Leitura dos resultados	44
4.2.3.4	Expressão dos resultados	45

4.2.3.5	Controles negativos	46
4.2.3.6	Viabilidade das linhagens bacterianas	46
4.2.4	Aplicação do Teste de Kado para avaliação do potencial mutagênico de chalconas sintéticas	47
4.2.4.1	Obtenção das chalconas	47
4.2.4.2	Avaliação da toxicidade das chalconas frente as linhagens TA98 e TA100 de <i>Salmonella typhimurium</i>	47
4.2.4.3	Teste de Kado	48
5	<i>Resultados e Discussão</i>	48
5.1	Confecção dos estoques de trabalho e permanente e avaliação das características genéticas	48
5.2	Validação da metodologia de microssuspensão (Teste de Kado)	55
5.3	Aplicação do Teste de Kado para avaliação do potencial mutagênico de chalconas sintéticas	60
5.3.1	Determinação das doses a serem avaliadas pelo Teste de Kado	60
5.3.2	Avaliação da toxicidade das chalconas frente as linhagens TA98 e TA100 de <i>Salmonella typhimurium</i>	61
5.3.3	Avaliação do potencial mutagênico das chalconas	64
6	<i>Conclusões</i>	69
7	<i>Referências bibliográficas</i>	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 MUTABILIDADE DO ADN

Nosso material genético está contido na molécula de ácido desoxirribonucleico, o ADN, em estruturas denominadas cromossomos (RABELLO-GAY, 1991).

O ADN é uma macromolécula orgânica complexa e frágil, de composição química limitada, composta por fitas duplas complementares que se estruturam em formato de dupla hélice. Cada fita da hélice corresponde a um polímero composto por nucleotídeos. Em termos de composição, os nucleotídeos apresentam a desoxirribose e o grupamento fosfato em comum e bases nitrogenadas distintas, sendo elas, adenina (A), guanina (G), timina (T) e citosina (C). Quando essas quatro bases são combinadas em várias sequências diferentes elas especificam a sequência de aminoácidos de uma proteína, ou seja, a informação contida no ADN é transmitida de acordo com a ordem da sequência polinucleotídica (KLUG et al., 2010; WATSON et al., 2006). O pareamento das bases nucleotídicas complementares (adenina pareia com timina e citosina com guanina) ocorre por ligações de hidrogênio o que contribui para a estrutura tridimensional do ADN (COOPER e HAUSMAN, 2007a).

O ADN desempenha um papel primordial na duplicação das células e na produção de proteínas, processos fundamentais para que os organismos mantenham a integridade das suas funções vitais (RABELLO-GAY, 1991).

Um gene é uma sequência, dentro da molécula de ADN que codifica um ARN (ácido ribonucleico) funcional (RABELLO-GAY, 1991). Quando a sequência ou a leitura correta de um gene é alterada dizemos que o ADN sofreu uma mutação (WATSON et al., 2006). Em outras palavras, uma mutação é qualquer alteração na sequência do ADN que, uma vez ocorrida, é mantida e pode ser transmitida às moléculas-filhas (RABELLO-GAY, 1991; WATSON et al., 2006).

A perpetuação do material genético, bem como a evolução e a diversidade das espécies depende da manutenção das taxas de mutação em níveis mínimos. Essas mutações podem ser iniciadas por processos endógenos, seja por algum erro durante a replicação do ADN ou por alguma molécula intrínseca do organismo que

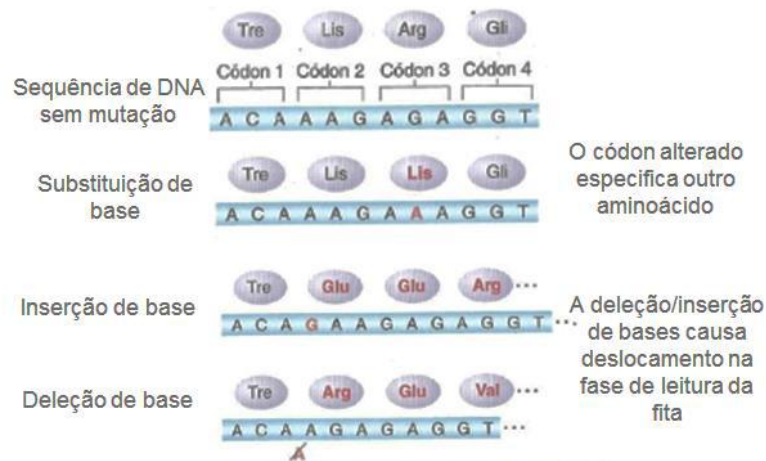
causa uma lesão espontânea ao nosso material genético, ou ainda por algum fator exógeno, seja ele químico ou físico (AMES et al, 1993; RIBEIRO e MARQUES, 2003).

Os principais processos endógenos que causam dano ao ADN envolvem reações de metilação, desaminação, oxidação e depurinação. A desaminação e a depurinação ocorrem por reações de hidrólise no organismo causando ou a perda de uma base purínica (G ou A) ou a conversão de uma citosina em uracila, respectivamente. Já as moléculas oxidantes endógenas, como as espécies reativas de oxigênio (EROs), são originadas do metabolismo aeróbico celular normal e podem causar dano oxidativo tanto à molécula de DNA quanto a seus precursores (AMES et al., 1993).

As EROs interagem com o ADN podendo causar danos extensos que podem ser perpetuados durante o processo de replicação e divisão celular (AMES et al., 1993; WATSON et al., 2006).

Os fatores exógenos capazes de causar alguma lesão no ADN são chamados de agentes mutagênicos ou mutágenos e podem aumentar ou acelerar o aparecimento e a taxa de mutações (RIBEIRO e MARQUES, 2003; WATSON et al., 2006).

As mutações podem ser divididas de acordo com o dano causado. No que diz respeito às mutações gênicas, as mais simples correspondem a alteração de uma base nucleotídica, ou conjuntos pequenos de bases, por outra (s), sendo denominadas de mutações pontuais, ou mutações de ponto. A inserção ou deleção de um nucleotídeo ou de um número reduzido de nucleotídeos ocasionam as mutações chamadas de mutações de deslocamento do quadro de leitura do ADN (Esquema 1). Mutações mais complexas, e que causam danos mais sérios no ADN, correspondem a inserções e deleções abrangendo vários genes causando rearranjos na estrutura do cromossoma, chamadas de aberrações cromossômicas (GRIFFITHS et al., 2013; RABELLO-GAY, 1991; WATSON et al., 2006).



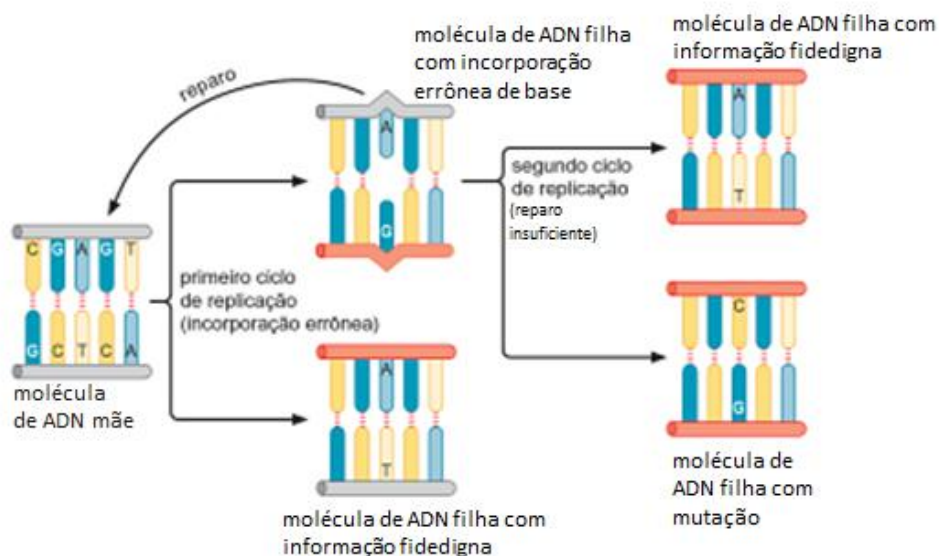
Esquema 1: Mutação pontual X Mutação por deslocamento do quadro de leitura na região codificadora de um gene; Fonte: ADAPTADO DE: GRIFFITHS, A.J.F., WESSLER, S.R., CAROLL, S.B., DOEBLEY, J. Mutação, reparo e recombinação. Introdução à genética. Editora Gen. 10ª Edição. p.480. 2013

A principal consequência molecular das mutações em uma região codificadora é a modificação da informação original contida no ADN que pode resultar em proteínas com estruturas ou funções modificadas (GRIFFITHS et al., 2013).

Os seres vivos possuem vários mecanismos de reparo de lesão do ADN, a fim de manter a integridade da informação contida na macromolécula. Um exemplo de sistema de reparo de lesão envolve o sistema de reparo por excisão, no qual o nucleotídeo danificado não é corrigido e sim removido do ADN. Neste caso, a fita que não foi danificada serve de molde para corrigir a fita danificada e pode ser que haja somente a remoção do nucleotídeo danificado ou de um segmento do ADN que contém a lesão. Um outro exemplo de sistema de reparo ocorre por recombinação e é utilizado quando as duas fitas de DNA estão danificadas e a informação para o reparo é extraída de uma nova sequência não-danificada (WATSON et al., 2006). Existe também o sistema de reparo propenso ao erro ou *error prone* que ocorre após a replicação, caso os outros sistemas de reparo falhem durante o processo. Neste processo moléculas de DNA polimerases especializadas são capazes de reconhecer o erro e promover a incorporação de bases sobre o sitio danificado na fita de ADN.

No entanto, essas polimerases podem induzir a incorporação de bases incorretas e por isso o sistema é passível de erro (COOPER e HAUSMAN, 2007b).

A maioria dos danos causados ao ADN é seguido por um processo de reparo. O sistema de reparo pode funcionar plenamente, revertendo completamente o dano causado, impedindo, desta forma, que ocorra mutações, ou o sistema de reparo pode estar sujeito a erros, sendo que, nesse último caso, a sequência alterada se tornará permanente no genoma e durante o próximo ciclo de replicação, o erro da fita de ADN molde irá direcionar para uma alteração permanente nas fitas recém sintetizadas, dando origem às mutações (Esquema 2) (RABELLO-GAY, 1991; WATSON et al., 2006).



Esquema 2: Representação da incorporação permanente de uma mutação durante o ciclo de replicação celular; Fonte : Adaptado de: WATSON, J.D., BAKER, T.A., BELL, S.P., GANN, A., LEVINE, M., LOSICK, R. Mutabilidade e Reparo do DNA. Biologia Molecular do Gene. Artmed. 7ª edição. p.315, 2015.

1.2 MUTAGÊNESE E CARCINOGENESE

Desde o desenvolvimento de técnicas que permitiram a descoberta e a caracterização de mutágenos começou a se discutir a repercussão que esses agentes teriam para o meio ambiente e para a saúde da população. Com a criação em 1969 da Sociedade Americana de Mutagênese (Environmental Mutagen Society), a Mutagênese Ambiental alcançou maior atenção e outras agências de pesquisa começaram a ser criadas como a Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental – SBMCTA, em 1989 (CLAXTON et al., 2010; RIBEIRO e MARQUES, 2003).

Com o desenvolvimento de pesquisas científicas relacionadas à mutagênese ambiental e o acúmulo de evidências de que agentes mutagênicos poderiam oferecer riscos para a população humana e para o meio ambiente, os governos despertaram para os perigos oferecidos pelos mutágenos. Desta forma, surgiu a necessidade de garantir a regulamentação desses agentes e o estudo e avaliação do potencial mutagênico, carcinogênico e teratogênico de toda e qualquer nova substância química e física que fossem ser introduzidas no mercado sob a forma de medicamentos, cosméticos, aditivos de alimentos, agentes químicos e outros. Surgiu então outro campo de estudo, a Toxicologia Genética (RIBEIRO e MARQUES, 2003).

A Toxicologia Genética ou genotoxicidade estuda os efeitos genotóxicos (efeitos tóxicos causado no material genético), de agentes químicos e físicos, ou seja, é um campo da ciência que busca o entendimento das interações desses agentes com o material genético, seus mecanismos e a resposta do organismo ao dano causado (GUACHALLA e ASCARRUNZ, 2003; RIBEIRO e MARQUES, 2003).

A área de estudo em questão busca caracterizar as lesões e alterações no ADN causadas por agentes mutagênicos pela identificação da substância e avaliação quantitativa do risco mutacional para o ser humano. Através dos resultados é possível estabelecer níveis aceitáveis de exposição a tais substâncias e propor medidas preventivas para a preservação do conteúdo genético (RABELLO-GAY, 1991).

A carcinogênese é o processo de conversão de uma célula normal em uma

célula maligna. A iniciação do processo carcinogênico é dada por uma alteração irreversível do ADN (LOUREIRO et al., 2002) e mutações causadas por mutágenos em vários genes críticos têm sido encontradas em neoplasias (RIBEIRO e MARQUES, 2003). Existem dados na literatura baseados no sequenciamento genômico de tumores que levaram a reforçar hipóteses de que a mutagênese é uma etapa inicial do processo de carcinogênese (CLAXTON et al., 2010).

Embora estudos em Genética Toxicológica não sejam indicadores de carcinogenicidade, são frequentemente usados em estudos sobre o desenvolvimento do câncer, uma vez que testes de mutagenicidade medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese (RIBEIRO e MARQUES, 2003).

1.3 O TESTE DE AMES

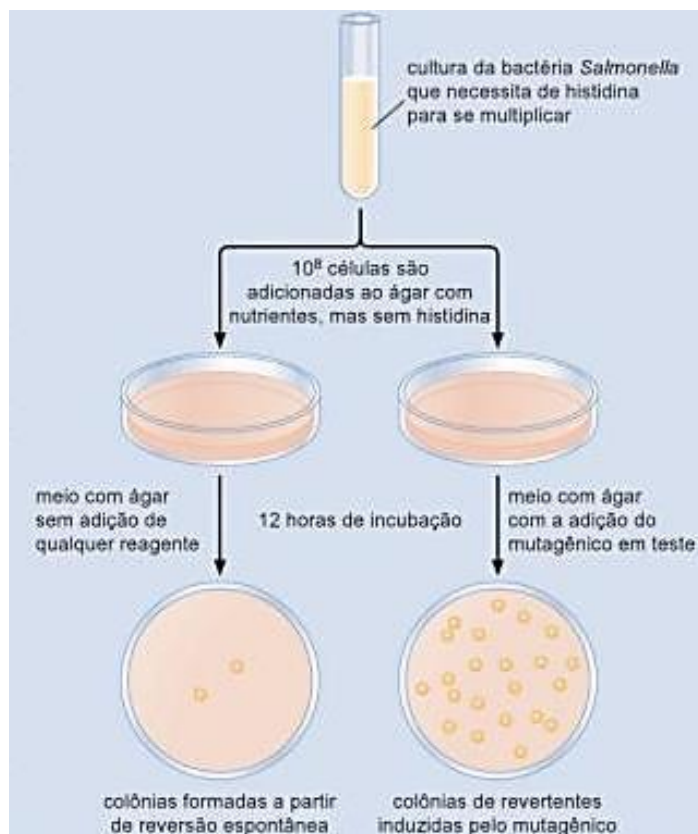
O Teste de Ames também conhecido como *Salmonella/microsome mutagenicity assay* foi desenvolvido no início da década de 70 por um grupo de pesquisadores da Universidade de Berkeley, na Califórnia (KOLATA, 1976), liderado pelo bioquímico Bruce N. Ames. O teste, a princípio, tinha como objetivo avaliar o potencial mutagênico de substâncias químicas e suas implicações na carcinogênese celular (AMES, 1974; KOLATA, 1976).

O teste foi validado em um grande estudo com mais de 300 substâncias químicas, dentre elas, muitas reconhecidamente carcinogênicas, já àquela época. Dentre os primeiros compostos mutagênicos detectados pelo Teste de Ames, que tiveram posteriormente a sua capacidade carcinogênica confirmada em testes *in vivo*, estavam aminas utilizadas até então em tinturas de cabelo, produtos derivados de exaustão do diesel e produtos proteicos derivados da pirólise de aminoácidos e proteínas de carnes e peixes durante seu cozimento, como os pirolisatos de triptofano, ácido glutâmico e da fenilalanina (MARON e AMES, 1983; RABELLO-GAY, 1987). Outros pesquisadores também utilizaram a mesma metodologia para testar substâncias químicas puras ou misturas, sendo que, até o ano de 1982, já haviam sido testados mais de 5000 compostos os quais foram registrados no Environmental Mutagen Information Center Index, nos Estados Unidos (TAGLIARI et al., 1999).

Basicamente, o teste emprega cepas de *Salmonella typhimurium* que apresentam mutações em vários genes que codificam a enzima responsável pela síntese de histidina, tornando-as dependente desse nutriente (auxotrofia para histidina). Essas linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo sem histidina, no entanto, na presença de um mutágeno a mutação da auxotrofia (his-) pode ser revertida e a bactéria passa a crescer no meio sem esse aminoácido, assim como demonstra o Esquema 3 (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Até o início dos anos 80 foi constatado que o Teste de Ames tinha boa reprodutibilidade e apresentava bons resultados na detecção de mutágenos. No entanto, foi observado que o mesmo falhava quando algumas substâncias carcinogênicas eram testadas (TAGLIARI et al., 1999). Desta forma, foram

introduzidas novas mutações nas linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas no teste a fim de aumentar a sensibilidade das mesmas na detecção de diversos tipos de agentes carcinogênicos e mutagênicos (MARON e AMES, 1983; TAGLIARI et al., 1999; UMBUZEIRO e VARGAS, 2003).



Esquema 3: Representação básica do Teste de Ames; Fonte: Adaptado de: WATSON, J.D., BAKER, T.A., BELL, S.P., GANN, A., LEVINE, M., LOSICK, R. Mutabilidade e Reparo do DNA. Biologia Molecular do Gene. Artmed. 7ª edição. p.321, 2015.

O Teste de Ames é uma metodologia *in vitro* de alta reprodutibilidade, flexibilidade e sensibilidade. Dessa forma, além de permitir a diminuição significativa da utilização de modelos animais em ensaios toxicológicos, constitui, hoje em dia, um dos modelos mais utilizados para avaliação primária da genotoxicidade de substâncias (CLAXTON et al., 2010; TAGLIARI et al., 1999).

Visto que as bactérias não são capazes de metabolizar substâncias químicas por reações enzimáticas via citocromo p450, assim como o organismo de mamíferos, e levando em consideração que muitas substâncias são ingeridas ou

entram em contato com os seres vivos em sua forma pró-ativa, outro componente chave também foi introduzido ao protocolo do Teste de Ames para aumentar a sensibilidade do ensaio. O mesmo se refere a um sistema exógeno de metabolização proveniente de células hepáticas de roedores. Esse sistema, também conhecido como sistema S9 de metabolização, mimetiza as reações enzimáticas de biotransformação do organismo, transformando substâncias passíveis de metabolização à sua forma ativa, permitindo assim a obtenção de resultados mais precisos (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Diversas linhagens de *Salmonella typhimurium* foram desenvolvidas ao longo dos anos para serem utilizadas no Teste de Ames. As mais utilizadas para fins de triagem são a TA98 e TA100 que mostraram grande eficiência na detecção de agentes mutagênicos. Outras linhagens como a TA102, TA97 ou TA137 também são empregadas na avaliação da mutagenicidade de substâncias dependendo do objetivo do ensaio, como por exemplo para fins regulatórios (UMBUZEIRO e VARGAS, 2003). Cada linhagem teste apresenta uma mutação diferente no operon do gene que codifica a enzima que sintetiza o aminoácido histidina. A linhagem TA100 apresenta uma mutação no gene *hisG46*. Essa mutação é resultante da substituição de uma leucina (GAG/CTC) por uma prolina (GGG/CCC) o que altera a codificação do gene para a primeira enzima da biossíntese da histidina. Essa mutação faz com que a linhagem TA100 seja usada para detectar mutágenos que causam substituição de pares de bases (MARON e AMES, 1983; UMBUZEIRO e VARGAS, 2003). A linhagem TA98 tem a mutação *hisD3052* que afeta a leitura correta de uma sequência de códons próxima a mutação. A leitura correta é influenciada pela inserção ou retirada de pares de bases nucleotídicas. Esse tipo de mutação confere à linhagem capacidade de detectar substâncias que causam mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura do DNA ou “*frame-shifts*” (MARON e AMES, 1983; UMBUZEIRO e VARGAS, 2003).

Além das características genéticas de auxotrofia para histidina, todas as linhagens possuem mutações adicionais que lhe permitem serem mais sensíveis aos diversos tipos de substâncias e moléculas (MARON e AMES, 1983). A mutação *rfa* confere um defeito na camada de lipopolissacarídeos que reveste a superfície bacteriana (MORTELMANS e ZEIGER, 2000), aumentando a permeabilidade da

célula à moléculas volumosas (MARON e AMES, 1983). A mutação *uvrB* consiste na deleção desse gene, responsável pela codificação e regulação de uma enzima responsável pelo sistema de reparo por excisão do DNA. Sem esse sistema de reparo, o DNA fica sujeito a um maior número de lesões reparadas por mecanismos errôneos, elevando assim a sensibilidade das linhagens na detecção de mutágenos (GRIFFITHS et al., 2013; UMBUZEIRO e VARGAS, 2003). A deleção deste gene se estendeu ao gene *bio* que codifica biotina, tornando as linhagens utilizadas no teste também dependentes desse nutriente. A adição do plasmídeo pKM101, em algumas linhagens, confere às mesmas resistência a ampicilina e, adicionalmente, através do gene *mucAB*, responsável pelo sistema de reparo passível de erro, aumenta a mutagênese espontânea e induzida (UMBUZEIRO e VARGAS, 2003).

1.4 MÉTODO DE MICROSSUSPENSÃO (TESTE DE KADO)

Desde que o Teste de Ames foi desenvolvido, pesquisadores de todo o mundo vem tentando desenvolver técnicas para aumentar a sensibilidade do método (KADO et al., 1983). Em 1983, Maron e Ames publicaram o protocolo das metodologias de incorporação em placas e de pré-incubação que são utilizadas mundialmente (MARON e AMES, 1983). Nesse mesmo ano, Kado e colaboradores desenvolveram a técnica de microssuspensão para avaliação de amostras de urina de fumantes (KADO et al., 1983).

Norman Y. Kado e seu grupo de pesquisa sugeriram uma nova abordagem para o teste de Ames, uma vez que as metodologias existentes ofereciam dificuldades para a detecção e avaliação da mutagenicidade de amostras com quantidades mínimas de agentes mutagênicos como, por exemplo, amostras de fluidos corporais de pacientes expostos a agentes quimioterápicos ou amostras de sedimentos de água (KADO et al., 1983).

A metodologia de Kado utiliza a cultura bacteriana 10 vezes mais concentrada e requer menor quantidade de amostra, sistema de metabolização e volume de cultura, quando comparado à metodologia de preincubação, o que acaba por aumentar em 10 vezes a sensibilidade do teste e torná-lo mais econômico (KADO et al., 1983; UMBUZEIRO et al., 2009).

Além da diferença da concentração da cultura bacteriana empregada, o teste de Kado permite que a amostra fique em contato com o sistema de metabolização e da linhagem de *Salmonella typhimurium* utilizada por um período de tempo determinado antes do plaqueamento, em um procedimento chamado de microssuspensão (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

1.5 CHALCONAS

A utilização de plantas para fins terapêuticos está profundamente enraizada na história da humanidade, tendo sido esta prática incorporada à medicina tradicional de diversas culturas e realizada até os dias de hoje. A busca por novas substâncias com potencial terapêutico a partir de produtos naturais tem sido estimulada em grande parte pela ampla utilização dos mesmos por uma parcela significativa da população e pelo grande potencial econômico (DUBICK, 1986).

A Organização Mundial de Saúde estima que 80% da população utiliza medicamentos provenientes de produtos naturais, isto é, oriundos de plantas, microrganismos, microrganismos marinhos e biomoléculas derivadas de organismos vivos (FONSECA e PEREIRA, 2004). Dentre as substâncias que uma planta é capaz de produzir, e que possuem atividades terapêuticas já comprovadas cientificamente, estão os metabólitos secundários, os quais compreendem substâncias químicas produzidas pelas plantas em resposta a estresses ambientais, como ataques de micro-organismos ou insetos, radiação, temperatura e umidade, para fins de proteção (FONSECA, 2012).

Diversos compostos oriundos de produtos naturais já tiveram sua estrutura química e seu mecanismo de ação elucidados de maneira direta ou indireta e são hoje amplamente utilizados na clínica médica como é o caso da morfina. No entanto, muitas classes de substâncias de origem natural são de difícil extração e purificação ou de difícil síntese (FONSECA, 2012).

As chalconas ou 1,3-diaril-2-propen-1onas, são compostos precursores da via biossintética dos flavonóides e isoflavonóides. São cetonas α,β -insaturadas com a porção carbonila e o fragmento olefínico ligados a anéis aromáticos como mostra a figura 1 (CORDEIRO, 2010; SILVA, 2009; ROCHA, 2011). São amplamente encontradas no vegetais, principalmente na folhas e flores e possuem importante papel na polinização das plantas (CORDEIRO, 2010).

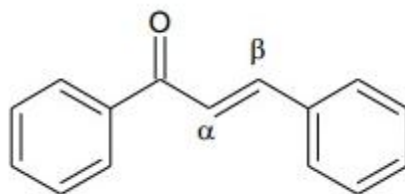


Figura 1: Estrutura geral das chalconas, destacando a ligação α,β -insaturada; Fonte: ROCHA, L,W. Avaliação do potencial anti-hiperalgésico de chalconas bioativas frente a diferentes modelos experimentais de dor persistente em camundongos. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Itajaí. 2011.

Devido a sua estrutura relativamente simples, a sua versatilidade sintética e à diversidade de atividades farmacológicas já descritas na literatura associadas a essa classe, as chalconas e seus derivados têm recebido grande atenção no que diz respeito ao desenvolvimento de novos fármacos associado à síntese de novas moléculas com diversos substituintes diferentes, visando melhorar a relação estrutura-atividade (CORDEIRO, 2010; FONSECA, 2012).

Dentre as atividade farmacológicas já comprovadas das chalconas destacam-se: anti-inflamatória, antipirética, antimutagênica, antitumoral, citotóxica, antioxidante (SILVA, 2009), antibacteriana, antifúngica (CORDEIRO, 2010), antimalárica, antimitótica, antiviral e antileishmania (FONSECA, 2012).

A 4-dimetilamino-chalcona (Figura 2A) apresenta atividade antimicobacteriana, já descrita na literatura, caracterizada para cepas de *Micobacterium tuberculosis* H37Rv (SIVAKUMAR et al., 2007) e a 3,4-(metilenodioxi)-chalcona (Figura 2B) atividade antibacteriana descrita para *Staphylococcus aureus* (SILVA et al., 2013). Mais recentemente, estas mesmas substâncias, codificadas como chalconas 4 e 5 respectivamente, foram caracterizadas pela sua atividade anti-inflamatória e ainda por sua ação antimicobacteriana comprovada em cepas hipervirulentas de *Micobacterium tuberculosis* Beijing M299 (VENTURA et al., 2015). Os valores de Concentração Mínima Inibitória das chalconas obtidas no estudo em questão estão representadas

na tabela 1.

As chalconas 4 e 5 são chalconas sintéticas obtidas a partir da reação entre aldeídos aromáticos substituídos apropriadamente com acetofenonas (VENTURA et al., 2015).

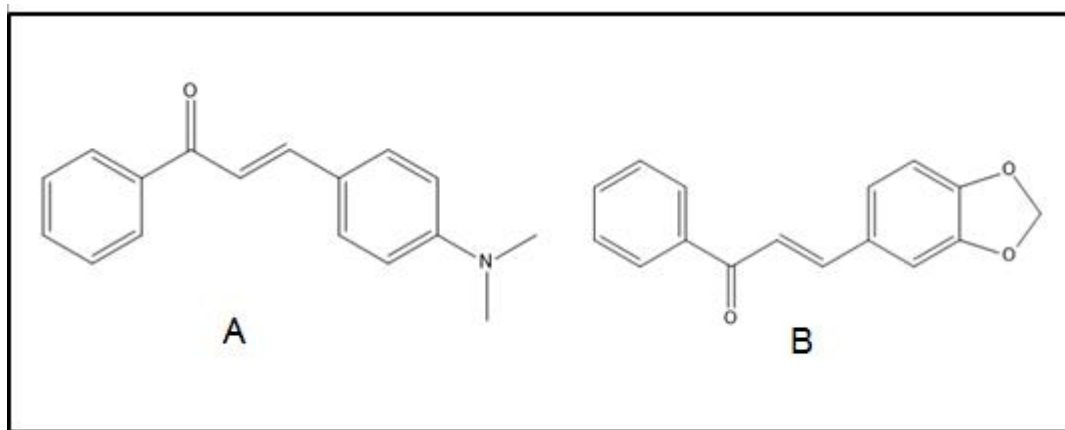


Figura 2: Estruturas moleculares da 4-dimetilamino-chalcona (A) e 3,4-(metilenodioxi)-chalcona (B); Fonte: Adaptado de: VENTURA, T. L. B.; CALIXTO, S. D.; ABRAHIM-VIEIRA, B. A.; DE SOUZA, A. M. T.; MELLO, M. V. P.; RODRIGUES, C. R.; MIRANDA, L. S. M.; SOUZA, R. O. M. A.; LEAL, I. C. R.; LASUNSKAIA, E. B.; MUZITANO, M. F. Antimycobacterial and anti-inflammatory activities of substituted chalcones focusing on an anti-tuberculosis dual treatment approach. *Molecules*. v.20, p.8072-8093, 2015

Tabela 1: Valores de concentração mínima inibitória das chalconas 4 e 5.

	CMI₅₀ (µM)	CMI₉₀ (µM)	CMI₅₀ (µM)	CMI₉₀ (µM)
Chalcona	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv		<i>M. tuberculosis</i> M299	
4	19,7±1,9	320,1±4,8	20,1±1,0	351,5±1,8
5	12,7±1,9	303,2±5,4	11,7±3,4	289,6±0,7

Adaptado de VENTURA et al., 2015

2 JUSTIFICATIVA

A utilização cada vez mais acentuada de produtos químicos como fármacos, agroquímicos, cosméticos, corantes e muitos outros vem provocando um aumento nas taxas de mutagênese ambiental (CLAXTON et al., 2010; FONSECA e PEREIRA, 2004; RIBEIRO e MARQUES, 2003). Desta forma, a poluição do ambiente que nos cerca, por produtos potencialmente capazes de causar danos ao nosso DNA, pode afetar as gerações atual e futura, não apenas a humana, mas também a de plantas, animais e microrganismos (RIBEIRO e MARQUES, 2003). Assim, agências reguladoras internacionais, como a Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), preconizam que sejam feitos estudos de genotoxicidade para avaliar o potencial de substâncias químicas de causar mutações genéticas. No Brasil, o registro de medicamentos e fitoterápicos somente é feito quando as indústrias/pesquisadores apresentam à ANVISA os resultados de uma bateria de testes pelos quais os candidatos a novos medicamentos e fitoterápicos tem que ser submetidos, dentre os quais, os estudos de genotoxicidade (ANVISA, 2013; OECD, 1997).

São duas opções de baterias de testes preconizados pela ANVISA para a avaliação da genotoxicidade de potenciais fármacos e fitoterápicos e, em ambos, o teste preliminar *in vitro* preconizado é o Teste de Ames. E segundo as recomendações descritas, um resultado positivo no Teste de Ames já é suficiente para postergar a avaliação da substância por outros ensaios, inclusive pelos ensaios de fase clínica (ANVISA, 2013).

Tendo em vista o avanço das pesquisas científicas no campus UFRJ-Macaé com o intuito de descobrir novas substâncias, oriundas de produtos naturais ou sintéticas, com potenciais ações farmacológicas, a disponibilidade de um teste rápido como o Teste de Ames para avaliar a segurança de substâncias pode constituir um grande aliado na busca por novos fármacos e fitoterápicos.

Além disso, a avaliação do potencial mutagênico da 4-dimetilamino-chalcona e da 3,4-(metilenodioxo)-chalcona se justifica na medida em que estudo recente sugere o emprego de ambas no tratamento da tuberculose. Desta forma, a segurança das mesmas deve ser avaliada.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Implantar o Teste de Ames na UFRJ-Macaé utilizando a metodologia de microssuspensão (Teste de Kado).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar os estoques permanentes e de trabalho das linhagens TA98 e TA100;
- Checar a manutenção das características genéticas das linhagens TA98 e TA100;
- Validar o Teste de Ames fazendo uso de substâncias reconhecidamente mutagênicas;
- Checar se a 4-dimetilamino-chalcona e a 3,4-(metilenodioxy)-chalcona são tóxicas para as linhagens TA98 e TA100;
- Aplicar a metodologia validada para avaliar o potencial mutagênico da 4-dimetilamino-chalcona e da 3,4-(metilenodioxy)-chalcona;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Equipamentos

Autoclave vertical (Prismatec), Agitador do tipo vórtex (Phoenix Lufenco, modelo AP-59), banho-maria (Nova Ética), banho-seco para tubos de ensaio (Novatecnica), contador manual de colônias (Phoenix Lufenco, modelo CP600 Plus), pipetas automáticas de volume variáveis (0,5µL - 1000µL) (Labmate Pro), ultra centrífuga refrigerada (Hitachi, Modelo CR-22N), balanças semi-analítica e analítica (Sartorius), espectrofotômetro (Kasuki, modelo IL-227), chapa de aquecimento (Biomixer, Modelo AM-10), câmara de segurança biológica classe II (Trox, modelo FLV-506), incubadora microbiológica (DeLeo), incubadora tipo “*shaker*” refrigerada (Solab, modelo SL-223), geladeira (Consul), e freezer -20°C (Eletrolux, modelo FE-

26), container de nitrogênio líquido (Cryofarm) e microscópio óptico (Olympus, modelo COVER-015).

4.1.2 Soluções e meios específicos

4.1.2.1 Solução de Vogel-Bonner (50X) (Sal VB)

Uso: Sais para a confecção das placas de agar mínimo

Sulfato de magnésio monohidratado (1g); ácido cítrico monohidratado (10g); fosfato de potássio dibásico anidro (50g); fosfato de sódio e amônio (17,5g); água ultra pura q.s.p. 100mL. Os sais foram adicionados à água (cerca de 50°C) um por um, na ordem em que foram citados, até completa dissolução. Após todos os sais estarem dissolvidos a solução foi esterilizada em autoclave a 121°C por 30 minutos.

4.1.2.2 Solução de Glicose 10%

Uso: Fonte de carbono a ser adicionada às placas de agar mínimo

A solução foi preparada solubilizando 10g de glicose em 100ml de água ultra pura e esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos.

4.1.2.3 Ágar mínimo (AM)

Uso: Utilizado no procedimento de checagem do genótipo e no Teste de Kado

200mL de solução estéril de glicose 10% w/v; 20mL de sal VB 50x estéril; 15g de ágar (Bacto Agar da Difco); água ultra pura q.s.p. 1L. O ágar foi adicionado à água ultra pura e autoclavado por 30 minutos a 121°C. Após o resfriamento do ágar até aproximadamente 65°C, foi adicionado o sal VB e a solução de glicose. O ágar mínimo foi preparado em condições estéreis dentro da câmara de fluxo laminar.

4.1.2.4 Placas de Ágar nutriente (AN)

Uso: Para estriar culturas a fim de se obter colônias isoladas; para testar sensibilidade ao cristal violeta (mutação *rfa*); para testar sensibilidade à radiação ultravioleta (deleção *uvrB*); para testar a viabilidade da bactéria

25g de caldo nutriente OXOID No. 2 (Nutrient broth OXOID No. 2); 15g de bacto Agar; água ultra pura fria q.s.p. 1L. A solução foi esterilizada em vidro de tampa rosqueável em autoclave a 121°C por 20 minutos e, após essa etapa, estabilizada em banho-maria a 50-60°C. Em câmara de fluxo laminar, 20-25 mL de agar nutriente foram plaqueadas em placas de petri estéreis.

4.1.2.5 Solução de biotina e histidina 0,5mM (Biotidina)

Uso: Para suplementar o agar de superfície com excesso de biotina e quantidade traço de histidina

7,7mg de L-Histidina (PM=155,16); 12,2mg de D-Biotina (PM=244,31); água ultra pura morna (aproximadamente 65°C) q.s.p. 100ml. Após completa dissolução dos dois reagentes a solução foi resfriada a temperatura ambiente e avolumada em balão volumétrico de 100mL. A solução de biotidina foi então esterilizada em autoclave a 121°C por 20 minutos.

4.1.2.6 Top Agar suplementado com solução de biotidina

Uso: Para dispensar a bactéria, substâncias que serão testadas e tampão ou mistura S9 ao ágar mínimo

Bacto Agar (6g); cloreto de sódio (6g); 100mL de solução de biotina e histidina 0,5mM; água ultra pura q.s.p. 1000mL. Após completa dissolução do bacto agar e do cloreto de sódio em 900ml de água, sob aquecimento e agitação constante, a solução de biotidina foi adicionada. A solução resultante foi homogeneizada, avolumada, autoclavada por 20 minutos a 121°C e estabilizada em banho seco a 45-48°C.

4.1.2.7 Caldo nutriente

Uso: Para crescer as linhagens TA98 e TA100 pernoite

O caldo nutriente utilizado foi o Oxoid No. 2 na proporção de 25g do pó para 1000 mL de água ultra pura. Após completa dissolução, o caldo foi imediatamente esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121°C e após resfriado, mantido em geladeira, protegido da luz, até o momento do uso.

4.1.2.8 Solução de Ampicilina (8mg/mL)

Uso: Para confirmar a presença do plasmídeo pKM101 nas linhagens TA98 e TA100 e para crescimento pernoite das linhagens

A ampicilina (0,08g) foi dissolvida em 10 mL de água ultra pura aquecida (aproximadamente 65°C) e esterilizada por membrana filtrante de 0,22µm dentro da câmara de fluxo laminar. A solução foi armazenada em geladeira sob proteção da luz.

4.1.2.9 Solução de Tetraciclina (8mg/mL)

Uso: Para checagem do genótipo

Para preparo dessa solução a tetraciclina (0,08g) foi solubilizada em 10 mL de solução de ácido clorídrico 0,02 N e esterilizada por membrana filtrante de 0,22µm dentro da câmara de fluxo laminar.

4.1.2.10 Solução de Biotina (0,01% ou 0,5mM)

Uso: Para enriquecer as placas de ágar mínimo para checagem do genótipo

A biotina (0,012 g) foi dissolvida em 100 mL de água ultra pura previamente fervida e esterilizada por membrana filtrante de 0,22 µm estéril dentro da câmara de

fluxo laminar. A solução foi armazenada em geladeira sob proteção da luz. A validade dessa solução é de 45 dias sendo, portanto, renovada frequentemente.

4.1.2.11 Solução de histidina (0,5% ou 32 mM)

Uso: Para enriquecer as placas de agar mínimo para checagem do genótipo

A histidina (0,5 g) foi completamente dissolvida em 100 mL de água ultra pura fria e autoclavada a 121°C por 20 minutos para esterilização.

4.1.2.12 Solução de cristal violeta (0,1% w/v)

Uso: Para confirmar a presença da mutação *rfa* nas linhagens TA98 e TA100

O cristal violeta (0,1 g) foi dissolvido em 100 mL de água destilada e armazenado em geladeira protegido da luz.

4.1.2.13 Placas de Agar mínimo suplementadas

Uso: Para caracterização do genótipo

As placas contendo aproximadamente 25 mL de agar mínimo foram suplementadas da seguinte forma: nas placas que deveriam conter somente biotina foram adicionados 8 µL da solução de biotina 0,01%; nas placas com biotina e histidina foram adicionados 8 µL da solução de biotina 0,01% + 8 µL da solução de histidina 0,5% ou 32 mM. As soluções de biotina e histidina foram espalhadas nas placas com o auxílio de uma alça de Drigalski previamente esterilizada.

4.1.2.14 Mistura para sistema de metabolização (S9): metabolismo oxidativo

Uso: Gerar um sistema fornecedor de NADH

Para preparar 2,0 mL de mistura S9 os reagentes abaixo foram adicionados na seguinte ordem:

Tabela 2: Reagentes utilizados no preparo da mistura S9

Reagentes	(μL)
Água destilada	792
Tampão Fosfato 0,2M	1000
NADP 0,1M	80
Glicose 6-P 1,0M	10
Sais (KCl 1,65M + MgCl₂ 0,4M)	40
S9	80

4.1.2.15 Tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7,4

Uso: Para preparo da mistura S9

Foi preparado através da mistura de 81 mL da solução de fosfato de sódio dibásico 0,2 M com 19 mL da solução de fosfato de sódio monobásico 0,2M. O ajuste do pH foi feito com as próprias soluções. A solução resultante foi autoclavada a 121°C por 20 minutos. O tampão foi armazenado em tubos tipo falcon (alíquotas de 10 mL).

4.1.2.16 Solução de glicose 6-fosfato 1,0M

Uso: Para preparo da mistura S9

A glicose 6-fosfato (1g) foi solubilizada com água ultra pura estéril fria (3,5 ml) e esterilizada por membrana filtrante (0,22 μ M), dentro da câmara de fluxo laminar, armazenada em tubos tipo eppendorf (alíquotas de 0,5 mL) e estocada em freezer a -20°C.

4.1.2.17 Solução de fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo – NADP 0,1M

Uso: Para preparo da mistura S9

O NADP (0,5 g) foi solubilizado com água ultra pura estéril fria (6,72 mL), homogeneizado delicadamente e esterilizado por membrana filtrante (0,22 µM), dentro da câmara de fluxo laminar, armazenado em tubos tipo eppendorf (alíquotas de 0,5 mL) e estocado em freezer a -20°C.

4.1.2.18 Solução de sais – Cloreto de magnésio 0,4M e Cloreto de potássio 1,65M

Uso: Para preparo da mistura S9

A solução foi preparada pesando-se os sais separadamente (MgCl₂ . 6H₂O: 8,13g; KCl: 12,3g) e dissolvendo-os em 100 mL de água ultrapura. A solução foi esterilizada em autoclave a 121°C por 20 minutos e armazenada em tubos tipo falcon (alíquotas de 15 mL) em geladeira.

4.1.2.19 S9

Uso: Para preparo da mistura S9

O homogenato de fígado de rato foi obtido comercialmente. O mesmo foi reconstituído em 2,1 mL de água ultra pura estéril, armazenado em tubos tipo eppendorf (alíquotas de 80 µL) e estocado em freezer a -20°C.

4.1.2.20 Preparo das amostras que foram utilizadas na validação do Teste de Kado

Para a validação do Teste de Kado as substâncias escolhidas foram as empregadas rotineiramente como controles positivos no ensaio. Para a linhagem TA98, foram utilizados o 2-Nitrofluoreno (2NF) e o 2 Amino-Antraceno (2AA) na ausência e na presença do sistema de metabolização S9, respectivamente. Já para a linhagem TA100, foram utilizados a Azida Sódica (AZS) e o 2AA na ausência e na presença do sistema de metabolização S9, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3: Substâncias utilizadas na validação do Teste de Kado na ausência (-S9) e presença (+S9) do sistema de metabolização

Linhagem	Validação		Controle Negativo*	
	(-)S9	(+)S9	(-)S9	(+)S9
TA98	2NF	2AA	DMSO	DMSO
TA100	AZS	2AA	Água	DMSO

* solventes usados no preparo das substâncias utilizadas na validação

Como os reagentes 2NF, AZS e 2AA são compostos reconhecidamente mutagênicos, todo o material usado na pesagem dos mesmos foi descartado para incineração e a balança analítica e seus arredores foram forrados com papel alumínio, a fim de evitar contaminação dos mesmos. Foi preparado um estoque de cada amostra na concentração de 1mg/mL.

O preparo das doses de 2NF, AZS e 2AA foi feito somente momentos antes do início do experimento, realizando diluições seriadas a partir do estoque de 1mg/mL dos reagentes. As doses escolhidas para a construção da curva dose-resposta foram definidas de acordo com os critérios estabelecidos pela OECD, levando em consideração também as doses de 0,15µg/placa de 2NF; 0,625µg/placa de 2AA e 5µg/placa de AZS que correspondem às doses descritas na literatura a serem utilizadas como controles positivos nos ensaios (MORTELMANS e AMES, 2000; OECD, 1991).

4.1.2.21 Preparo dos estoques e doses de chalconas

Foi preparado um estoque principal (30mM) das chalconas 4 e 5 diluindo o pó das respectivas substâncias em DMSO estéril, o qual foi esterilizado por membrana filtrante (0,22µM) dentro da câmara de fluxo laminar. A partir do estoque principal foram feitas diluições seriadas para obtenção das concentrações investigadas no teste de Kado (Tabela 4).

Tabela 4: Concentrações das chalconas e respectivas doses investigadas no teste de Kado

Concentração (μM)	Dose ($\mu\text{g/placa}$)
1430	1,8
450	0,56*
140	0,175*
40	0,05
12	0,015

*0,56 para a chalcona 4 e 0,57 para a chalcona 5; 0,175 para a chalcona 4 e 0,176 para a chalcona 5

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Manutenção e estoque das linhagens

4.2.1.1 Preparo inicial dos estoques de TA98 e TA100

Os estoques permanente e de trabalho de TA98 e TA100 foram preparados a partir de amostras de *Salmonella typhimurium* fornecidas em placas de agar nutriente, gentilmente cedidas pelo professor Álvaro C. Leitão, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Ilha do Fundão.

Todos os procedimentos descritos abaixo foram utilizados para preparar ambas as linhagens e foram conduzidos em condições estéreis, dentro da câmara de fluxo laminar previamente limpa com álcool 70%.

Com o auxílio de uma alça de inoculação estéril, um pequeno inóculo foi retirado da placa de agar nutriente e transferido imediatamente para um erlenmayer estéril contendo 5,0 ml de caldo nutriente e 25 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. A cultura bacteriana foi incubada pernoite (aproximadamente 16 horas), a 37°C, sob agitação a 120rpm.

No dia seguinte à incubação, as culturas foram estriadas, com alça de inoculação, em placas de ágar nutriente, de forma a obter colônias isoladas. As placas foram incubadas invertidas em incubadora a 37°C pernoite (15-18 horas) e,

ao fim da incubação, 5 colônias isoladas e aparentemente saudáveis de cada linhagem foram escolhidas e transferidas isoladamente para tubos tipo falcon estéreis contendo 6mL de caldo nutriente. Os tubos foram incubados pernoite (15-18 horas), a 37°C sob agitação constante de 150-170 rpm (incubadora tipo shaker).

As culturas resultantes tiveram a sua densidade ajustada, passaram pelas provas genéticas e, aquelas que apresentaram melhor performance nas provas genéticas, foram utilizadas para a confecção dos estoques permanente e de uso rotineiro.

4.2.1.2 Ajuste da densidade das células

A densidade das células foi ajustada para garantir que a concentração das mesmas estava na faixa adequada para o preparo dos estoques (1 a 2×10^{10} UFC/ml) (KADO et al., 1983). Para tal, uma alíquota de 1mL da cultura foi retirada e homogeneizada com 2 mL de caldo nutriente e a absorbância dessa suspensão foi medida em espectrofotômetro a 650nm ($D.O._{650nm} = 0,4$). Caso a leitura não correspondesse ao esperado a densidade da cultura era ajustada com meio (se a absorbância estivesse $> 0,4$) ou com a cultura (se a absorbância estivesse $< 0,4$).

4.2.1.3 Preparo dos estoques permanentes de TA 98 e TA 100

As ampolas de congelamento foram previamente identificadas com a linhagem, com o número da colônia escolhida na etapa de isolamento e a data do preparo. Posteriormente, foram adicionados à ampola 900µL da cultura resultante do procedimento do item 4.2.1.2. e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). As ampolas foram homogeneizadas levemente e armazenadas em freezer a -20°C até a finalização da verificação das características genéticas (item 4.2.2).

As ampolas de cada linhagem, contendo as culturas aprovadas no teste de verificação do genótipo, foram então transferidas para o container de nitrogênio líquido e tiveram a data do congelamento registrada.

4.2.1.4 Preparo dos estoques de uso rotineiro ou de trabalho da TA98 e TA100

Os tubos plásticos tipo Eppendorf foram identificados com a data de preparo, linhagem e o número da colônia escolhida na etapa de isolamento. Aos tubos plásticos correspondentes foram adicionados 180 µL da cultura obtida no item 4.2.1.2 e 20µL de DMSO.

As linhagens foram então armazenadas no congelador até a finalização da verificação das características genéticas (item 4.2.2) e em seguida armazenadas em nitrogênio líquido.

4.2.2 Verificação das características genéticas

As culturas obtidas no item 4.2.1.1. foram submetidas a uma série de testes para a confirmação dos genótipos das linhagens TA98 e TA 100 de *Salmonella typhimurium*. Ao final de cada procedimento, as placas foram incubadas invertidas, em incubadora, a 37°C por 12-24 horas.

4.2.2.1 Dependência de histidina

As culturas obtidas conforme descrito no item 4.2.1.1 foram testadas quanto a manutenção da mutação que as fazem dependentes de histidina, semeando-as, uma a uma com zaragatoa estéril, em placa de ágar mínimo suplementada com biotina e em placa de ágar mínimo suplementada com biotina e histidina.

4.2.2.2 Mutação *rfa* (sensibilidade ao cristal violeta)

As culturas obtidas conforme descrito no item 4.2.1.1 foram testadas quanto a manutenção da mutação *rfa*, que causa perda parcial da barreira de lipopolissacarídeos da parede bacteriana, semeando-as, uma a uma, com zaragatoa, em placa de ágar nutriente. Após secagem da semeadura, no centro da mesma foi colocado disco de papel de filtro estéril, de aproximadamente 5mm de diâmetro e 1mm de espessura, embebido com 40 µL de solução de cristal violeta 0,1%.

4.2.2.3 Deleção *uvrB* (sensibilidade à radiação ultravioleta)

As culturas obtidas conforme descrito no item 4.2.1.1 foram testadas quanto a manutenção da mutação *uvrB*, que leva a um maior número de lesões reparadas por mecanismos sujeitos a erro, semeando-as, uma a uma com zaragatoa estéril, em faixas horizontais em placa de ágar nutriente. Cinco culturas foram semeadas em uma mesma placa. Após a secagem da sementeira, foi retirada a tampa da placa e metade da mesma foi coberta com papel alumínio estéril antes da irradiação com luz germicida por 15 segundos.

4.2.2.4 Presença do plasmídeo pKM101

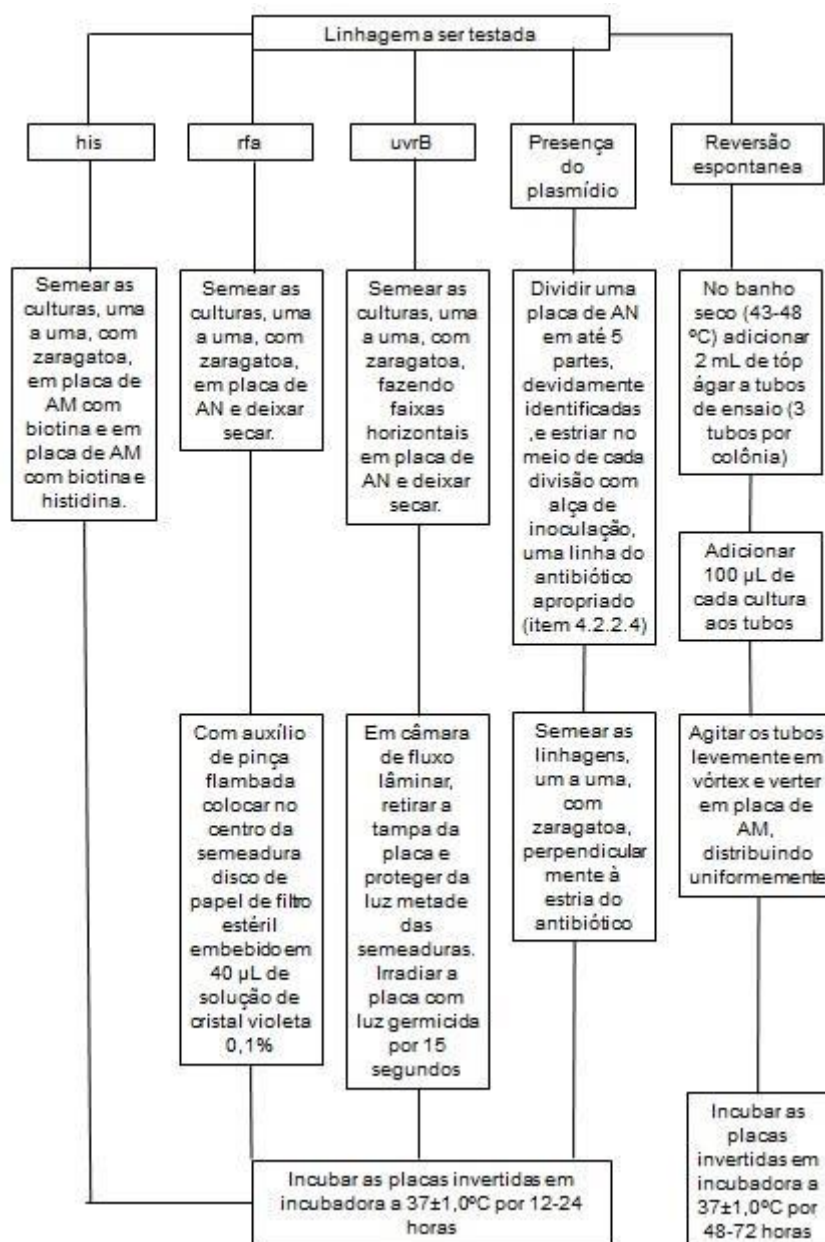
A presença do plasmídeo pKM101, que aumenta a atividade do sistema de reparo passível de erro, foi avaliada semeando as culturas obtidas conforme descrito no item 4.2.1.1 em placas de ágar nutriente. Previamente, a placa foi dividida em cinco partes devidamente identificadas e, no meio de cada divisão, com alça de inoculação, uma linha do antibiótico ampicilina foi traçada na placa teste e outra do antibiótico tetraciclina na placa controle. As linhagens foram semeadas, uma a uma, perpendicularmente à estria do antibiótico. A concentração dos estoques de antibióticos era de 8,0 mg/mL.

4.2.2.5 Taxa de reversão espontânea

No banho seco (43-48°C), foram adicionados 2mL de top ágar a tubos de ensaio e a cada tubo foi adicionado 100 µL das culturas obtidas conforme descrito no item 4.2.1.1, em triplicata. Os tubos foram levemente agitados em vórtex e vertidos em placas de ágar mínimo, de forma a distribuir uniformemente o seu conteúdo.

Ao final dos testes de verificação da manutenção das características genéticas, os resultados foram registrados e avaliados e as culturas que apresentaram a melhor performance foram selecionadas para serem utilizadas no Teste de Kado.

Esquema 4: Representação do ensaio de verificação das características genéticas (provas genéticas) das linhagens TA98 e TA100



4.2.3 Validação do Teste de Kado

4.2.3.1 Procedimentos iniciais

4.2.3.1.1 Preparo das culturas das linhagens TA98 e TA100

O preparo das culturas foi realizado na véspera do dia do ensaio. 100 µL da cultura, proveniente do estoque de trabalho armazenado em nitrogênio líquido,

foram transferidos imediatamente após descongelamento para erlenmayer contendo 20 mL de caldo nutriente estéril acrescido de 25 µg/mL de solução de Ampicilina. O inóculo foi incubado por 15-18 horas, a 37°C, sob agitação constante (150-170 rpm). No dia seguinte, a cultura foi mantida sob refrigeração e protegida da luz até o momento da centrifugação.

A centrifugação foi realizada em ultra centrífuga refrigerada, por 10 minutos, a 4°C, a 10.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e descartado e as células foram ressuspensas em 4 mL de solução 1:13 de tampão fosfato 0,2M, sem agitar excessivamente. Novamente a cultura foi mantida sob refrigeração até o momento de ser utilizada.

4.2.3.1.2 Fundição do top ágar

O top ágar foi fundido em banho maria, sem deixá-lo ferver, e estabilizado em banho seco a 45-48°C (procedimento necessário para mantê-lo liquefeito e a uma temperatura adequada para não danificar as células).

4.2.3.1.3 Identificação das placas com ágar mínimo e dos tubos de ensaio empregados na validação do Teste de Kado

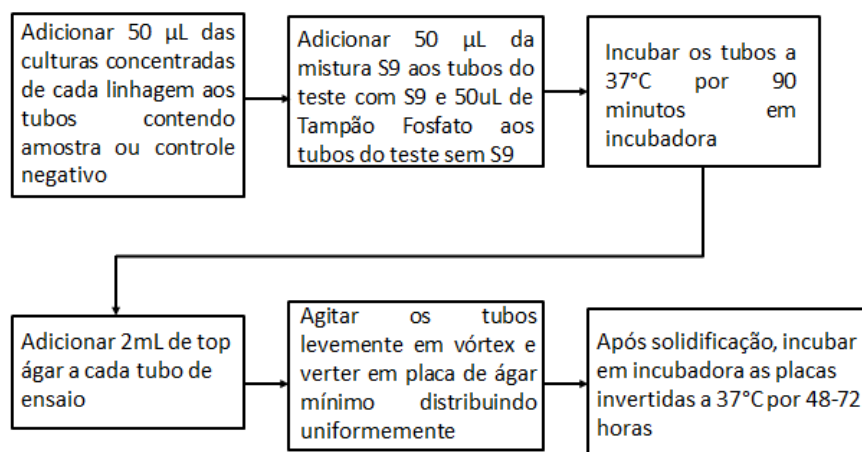
Todas as placas de ágar mínimo utilizadas no ensaio foram identificadas previamente com as doses de 2NF, AZS e 2AA testadas e os controles negativos em questão, usando cores previamente padronizadas para diferenciar as linhagens (TA100 ou TA98) e as condições do ensaio (com ou sem o sistema de metabolização).

Os tubos de ensaio foram também devidamente identificados do mesmo modo que as placas e distribuídos em estantes em número suficiente para realização do ensaio, levando-se em consideração as linhagens, doses estabelecidas e as condições do ensaio (com ou sem o sistema de metabolização).

4.2.3.2 Execução do Teste de Kado

O ensaio de validação foi realizado adicionando-se 50 μL das culturas concentradas de cada linhagem (obtidas conforme descrito no item 4.2.3.1.1) aos tubos de ensaio contendo previamente as diferentes doses de 2NF, AZS, 2AA ou controle negativo (volume fixo de 5 μL). Posteriormente, 50 μL da mistura S9 foram adicionados aos tubos do ensaio realizado na presença de S9. Aos tubos do ensaio realizado na ausência do sistema de metabolização foram adicionados 50 μL de solução 1:13 de Tampão Fosfato 0,2M. Os controles negativos foram feitos em quintuplicata e o ensaio com os reagentes reconhecidamente mutagênicos foram feitos em triplicata, procedendo conforme o fluxograma:

Esquema 5: Representação do Teste de Kado



4.2.3.3 Leitura dos resultados

O resultado do teste foi avaliado pela contagem do número de revertentes por placa com auxílio de um contador manual de colônias e as leituras foram devidamente anotadas. No momento de cada leitura das placas, foi verificado a presença de crescimento de fundo ou “background” nas placas-teste e controles. A presença de toxicidade, contaminação ou outras ocorrências foram devidamente registradas.

4.2.3.4 Expressão dos resultados

Os resultados foram expressos qualitativamente em positivos e negativos.

Para definir qualitativamente a mutagenicidade das amostras analisadas foi levado em conta a Razão de Mutagenicidade (RM). A RM das amostras foram calculadas dividindo-se a média do número de revertentes na placa teste (espontâneos e induzidos) pela média do número de revertentes por placa do controle negativo (espontâneos).

A partir dos resultados obtidos, foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada dose analisada, que é a média do número de revertentes na placa teste (espontâneos + induzidos) dividida pela média do número de revertentes por placa do controle negativo. Amostras com RM maior ou igual a 2 e com uma relação dose-resposta estatisticamente comprovada são consideradas positivas quanto à mutagenicidade. Por sua vez, as amostras são consideradas negativas para o Teste de Kado, quando a mesma não induzir aumento significativo no número de revertentes e suas RM forem todas menores que 2 (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

A análise estatística e interpretação dos resultados foi realizada através do programa SALANAL (elaborado e gentilmente cedido pelo Dr. L. Myers do Research Triangle Institute (RTP) da Carolina do Norte, EUA, por intermédio da Dra. Débora Roubicek (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB)). Este programa permite avaliar o efeito dose-resposta através do cálculo da análise da variância entre as médias do número de revertentes nas diferentes doses testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. O modelo do programa escolhido para a análise dos dados foi o modelo Berstein (Berstein e colaboradores, 1982).

Os resultados são fornecidos pelo programa em termos de probabilidade, sendo:

- análise de variância (ANOVA - Teste F): valores de p menores ou iguais a 5% (0,001) indicam que há diferença significativa entre os resultados obtidos das diferentes doses testadas;

- dose-resposta: valores de p iguais ou menores que 5% (0,001) indicam positividade na dose-resposta;

- Modelo: quanto > o valor de p , mais ajustados estão os dados em relação ao modelo escolhido para a análise.

4.2.3.5 Controles negativos

Todos os ensaios foram realizados incluindo controles negativos para determinar a taxa de reversão espontânea das linhagens utilizadas na presença e ausência de S9. A faixa esperada de reversão espontânea esta descrita na tabela 5 (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

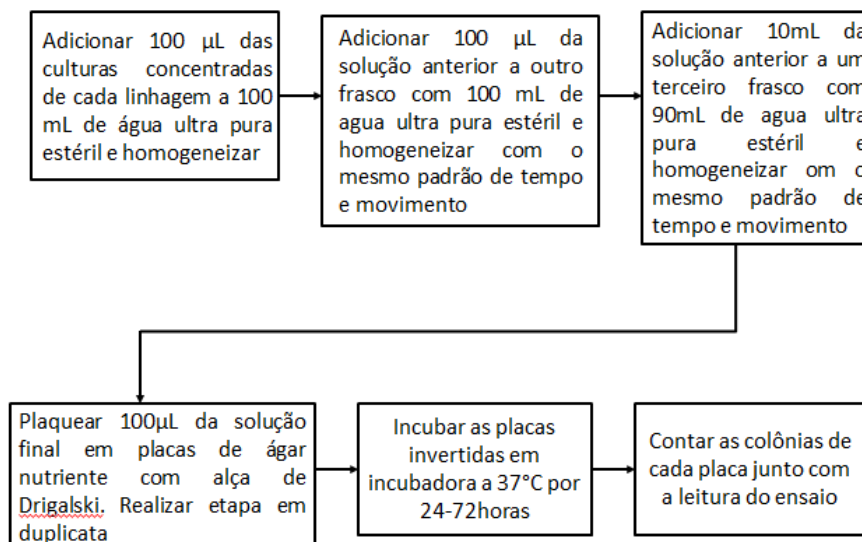
Tabela 5: Limites esperados de reversão espontânea das linhagens TA98 e TA100

Linhagem	Reversão mínima	Reversão máxima
TA98 (\pm S9)	20	50
TA100 (\pm S9)	75	200

4.2.3.6 Viabilidade das linhagens bacterianas

Ao final de cada ensaio foi avaliada a viabilidade das linhagens para verificação do requisito densidade de células (aproximadamente $0,5-1,0 \times 10^{10}$ UFC/mL) conforme descrito em KADO et al., 1983. O fluxograma a seguir descreve esse procedimento.

Esquema 6: Representação do ensaio de viabilidade



Vale ressaltar que o ensaio é feito em triplicata. A água para diluição foi previamente esterilizada em autoclave a 121°C por 20 minutos e resfriada até a temperatura ambiente antes do ensaio.

4.2.4 Aplicação do Teste de Kado para avaliação do potencial mutagênico de chalconas sintéticas

4.2.4.1 Obtenção das chalconas

As chalconas 4 e 5 foram sintetizadas pelo grupo do Prof. Rodrigo Octávio Mendonça Alves de Souza do Instituto de Química da UFRJ e gentilmente cedidas pela Profa. Michelle Muzitano da UFRJ-Macaé.

4.2.4.2 Avaliação da toxicidade das chalconas frente as linhagens TA98 e TA100 de Salmonella typhimurium

Para a avaliação de uma possível toxicidade das chalconas frente às linhagens TA98 e TA100 foi utilizada metodologia similar à usada em antibiogramas (adaptação da metodologia para ensaio de sensibilidade a antibacterianos) (Farmacopéia Brasileira, 4ª edição, 1988). Foram pipetados em discos de papel de filtro estéril 40 µL de solução das chalconas (15, 30 e 300µM) e esses foram posicionados, no centro da semeadura das linhagens TA98 e TA100, em placas de

agar nutriente. As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em incubadora bacteriológica.

4.2.4.3 Teste de Kado

O ensaio para avaliação da mutagenicidade das chalconas foi realizado conforme descrito no item 4.2.3.2, sendo que os controles positivos e negativos utilizados no ensaio encontram-se descritos na Tabela 3.

Foram utilizados 0,15 µg/placa de 2NF; 0,625 µg/placa de 2AA e 5 µg/placa de AZS que correspondem às doses descritas na literatura a serem utilizadas como controles positivos nos ensaios (MORTELMANS e ZIGER, 2000; OECD, 1997). Para as chalconas foram utilizadas doses de 0,015 – 1,8µg/placa. As doses (Tabela 4) foram determinadas de acordo com o protocolo da OECD (1997) levando em conta os valores de concentração mínima inibitória (CMI) (Tabela 1) das chalconas.

4.2.4.4 Análise microscópica das colônias revertentes

A análise microscópica das placas foi realizada em microscópio óptico com aumento de 40X para avaliar o crescimento de fundo (*background*) nas placas teste em comparação com os controles negativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONFECÇÃO DOS ESTOQUES DE TRABALHO E PERMANENTE E AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

A confirmação do genótipo das linhagens a serem empregadas no teste é de extrema importância para garantir que as mesmas respondam de maneira adequada ao ensaio. Essa avaliação deve ser realizada sempre que novos estoques de culturas são preparados ou caso haja algum problema na resposta das células durante o ensaio como, por exemplo, uma frequência muito baixa de reversão espontânea por placa (MARON e AMES, 1983).

A avaliação das características genéticas foi feita simultaneamente ao preparo dos estoques de trabalho e de cultura permanente das linhagens T98 e TA100.

A auxotrofia para histidina das linhagens de *Salmonella typhimurium* empregadas no Teste de Ames é a característica fundamental e base para o ensaio, uma vez que em contato com uma substância mutagênica a bactéria é capaz de reverter essa mutação e começar a produzir a histidina, crescendo e se multiplicando no meio (MORTELMANS e AMES, 2000). Portanto, a determinação da presença dessa mutação nas linhagens é de extrema importância. Para tal, deve-se comprovar que a bactéria é incapaz de crescer no meio sem histidina.

Conforme demonstrado na figura 3 (e representado também na tabela 6), todas as colônias testadas, de ambas as linhagens, foram incapazes de crescer nas placas contendo somente o nutriente biotina (figuras 3a e 3c). Contudo, todas as colônias testadas apresentaram crescimento nas placas suplementadas com histidina e biotina (figuras 3b e 3d) confirmando, desta forma, a auxotrofia para a histidina.

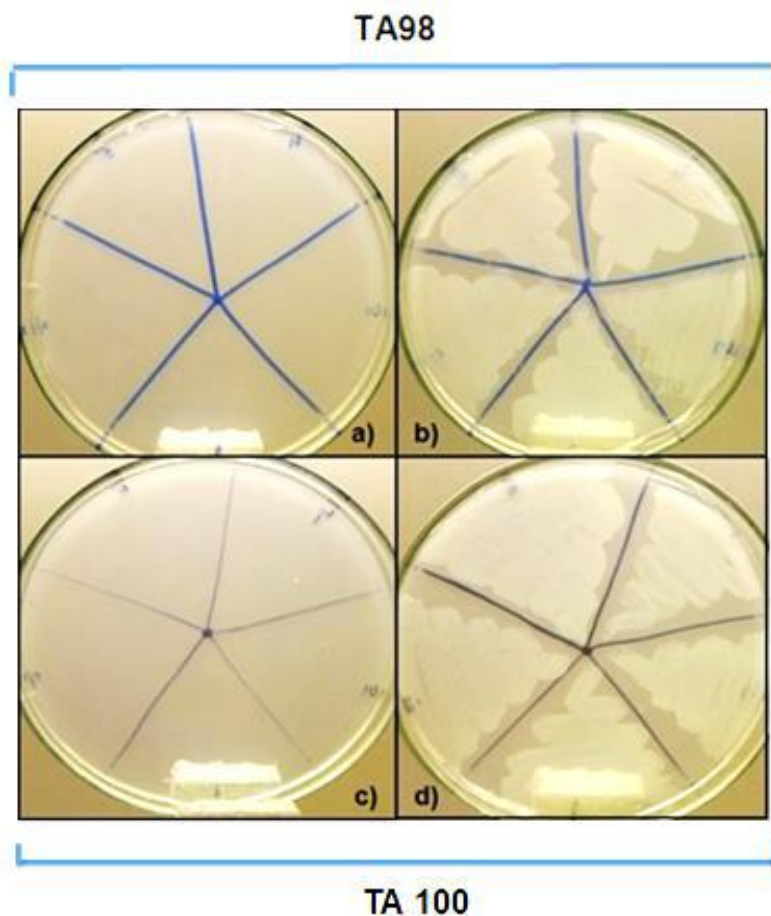


Figura 3: Avaliação da auxotrofia para histidina nas linhagens TA98 e TA100. Em a e c placas suplementadas somente com biotina; b e d placas suplementadas com biotina e histidina.

A mutação *rfa* facilita a difusão de moléculas grandes para dentro da bactéria, devido a perda parcial da barreira lipopolissacarídica que reveste a superfície bacteriana. O cristal violeta é uma substância de alto peso molecular e tóxico para a *Salmonella*. As moléculas dessa substância conseguem ultrapassar a membrana, penetrar na célula e causar a morte da bactéria. Experimentalmente, a presença dessa mutação é confirmada pelo aparecimento de um halo de inibição de crescimento bacteriano em volta do disco de papel contendo cristal violeta posicionado em cima da sementeira. Esse halo de inibição deve ter aproximadamente 14 mm de circunferência e quanto maior o halo melhor o desempenho da colônia na prova genética (MARON e AMES, 1983).

Na figura 4 vemos os resultados obtidos na avaliação da manutenção da

mutação *rfa* nas linhagens TA98 e TA100. Em todas as colônias isoladas houve o aparecimento de um halo de inibição, sendo que as colônias 4 e 5 da linhagem TA98 apresentaram halo de inibição com diâmetro igual a 14 mm. Todas as colônias da linhagem TA100 apresentaram halo maior que 14 mm, sendo que a colônia 4 apresentou o maior halo de inibição com 17mm de diâmetro (conforme mostrado também na tabela 6).

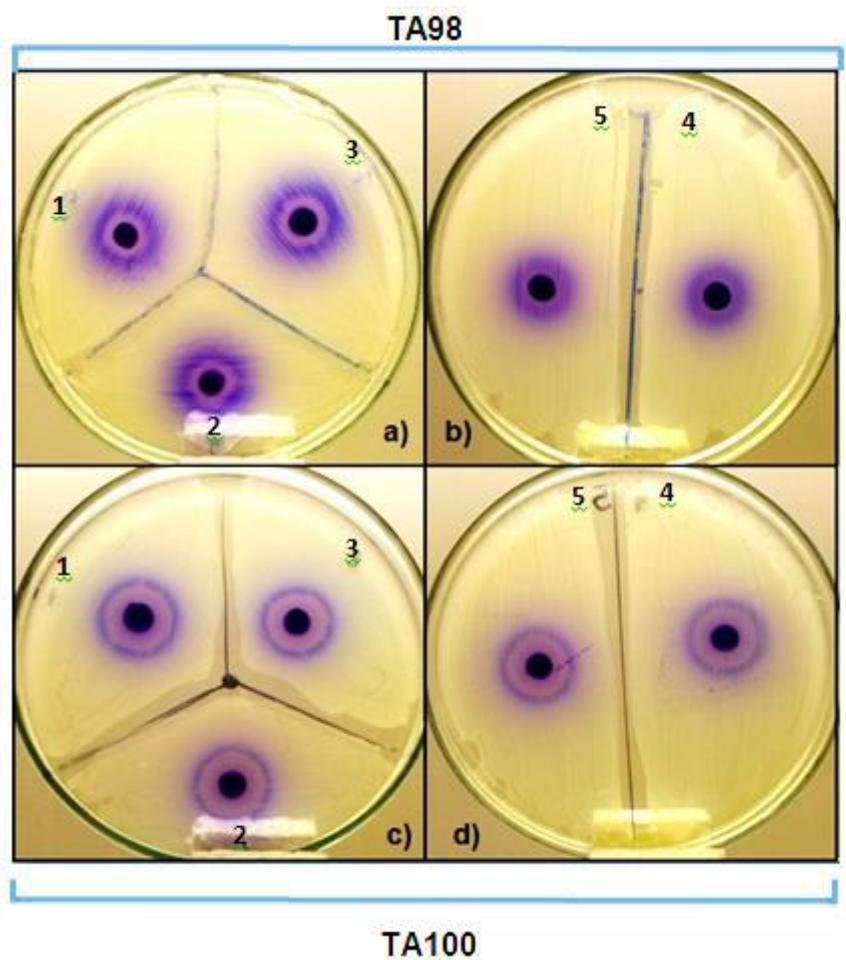


Figura 4: Avaliação da manutenção da mutação *rfa* nas linhagens TA98 e TA100

Outra mutação muito importante incorporada às linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas no Teste de Ames é a deleção do gene *uvrB*. Essa deleção, além de proporcionar a elevação do número de lesões no ADN que são reparadas por mecanismos sujeitos a erro, faz com que as linhagens sejam dependentes do nutriente biotina, uma vez que esta deleção estendeu-se até o gene responsável

pela síntese de biotina. Esta mutação dificulta a liberação de resultados falsos negativos, uma vez que o aumento da atividade dos mecanismos de reparo sujeitos a erro diminuem as chances de que uma lesão no ADN, induzida por um mutágeno, seja reparada de forma correta e ele deixe de ser detectado (MORTELMANS e AMES, 2000).

O teste para avaliar a presença dessa característica é simples e pode ser realizado através da irradiação com radiação ultravioleta germicida de placas contendo as linhagens. Cepas contendo a deleção do gene *uvrB* não são capazes de reparar de forma correta as lesões no DNA causadas pela radiação, tornando-se, portanto, incapazes de crescerem nas placas devido a um acúmulo de lesões (MARON e AMES, 1983).

Na figura 5 está demonstrado o resultado desse experimento e é possível notar que, para ambas as linhagens, o lado da placa que foi irradiado (I) praticamente não apresentou crescimento bacteriano enquanto que o lado da placa não irradiado (NI) apresentou um crescimento bastante denso confirmando, assim, a deleção do gene *uvrB* nas linhagens TA98 e TA100.

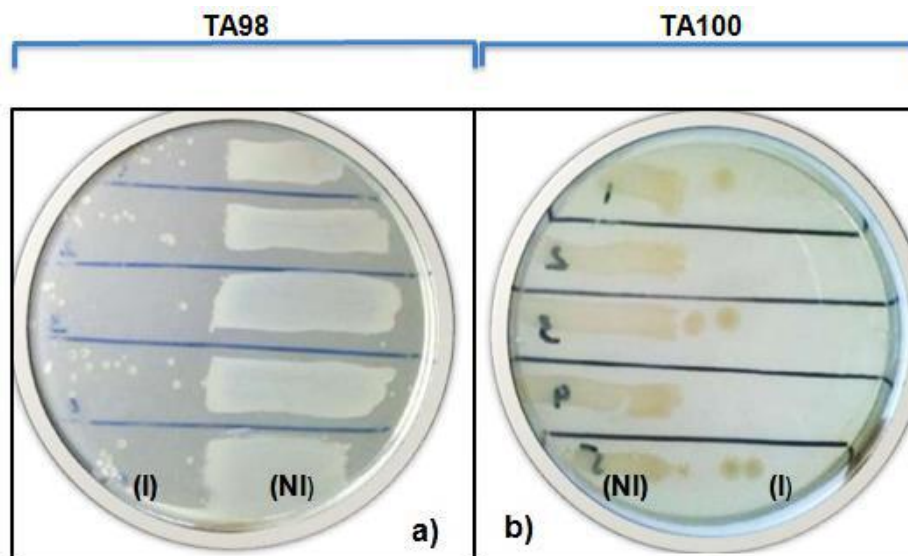


Figura 5: Avaliação da mutação *uvrB* nas linhagens TA98 e TA100. (I) representa o lado da placa irradiado com luz ultra violeta e (NI) representa o lado da placa não irradiado com luz ultra violeta.

A introdução do plasmídeo pKM101 em algumas linhagens de *Salmonella typhimurium*, além de aumentar a susceptibilidade à mutagênese, confere resistência ao antibiótico ampicilina o que evita a contaminação cruzada com outros tipos de bactérias e com cepas selvagens da *Salmonella typhimurium* que não são resistentes à esse antibiótico (MARON e AMES, 1983; MORTELMANS e AMES, 2000).

A confirmação dessa característica é realizada semeando-se a bactéria em meio contendo ampicilina e comparando com uma semeadura feita em meio contendo um outro antibiótico, geralmente tetraciclina (MARON e AMES, 1983). A presença do plasmídeo é confirmada pelo crescimento das bactérias no meio contendo ampicilina e ausência de crescimento na presença da tetraciclina.

Observando os resultados obtidos na figura 6 (representados também na Tabela 6) temos que para a linhagem TA98 as colônias 1, 2, 3 e 4 responderam adequadamente ao teste, ou seja, mostraram resistência à ampicilina (Fig. 6a) e não cresceram na presença de tetraciclina (Fig. 6b, cabeças de seta), enquanto que para a linhagem TA100 somente as colônias 3, 4 e 5 responderam adequadamente (Fig. 6d, cabeças de seta).

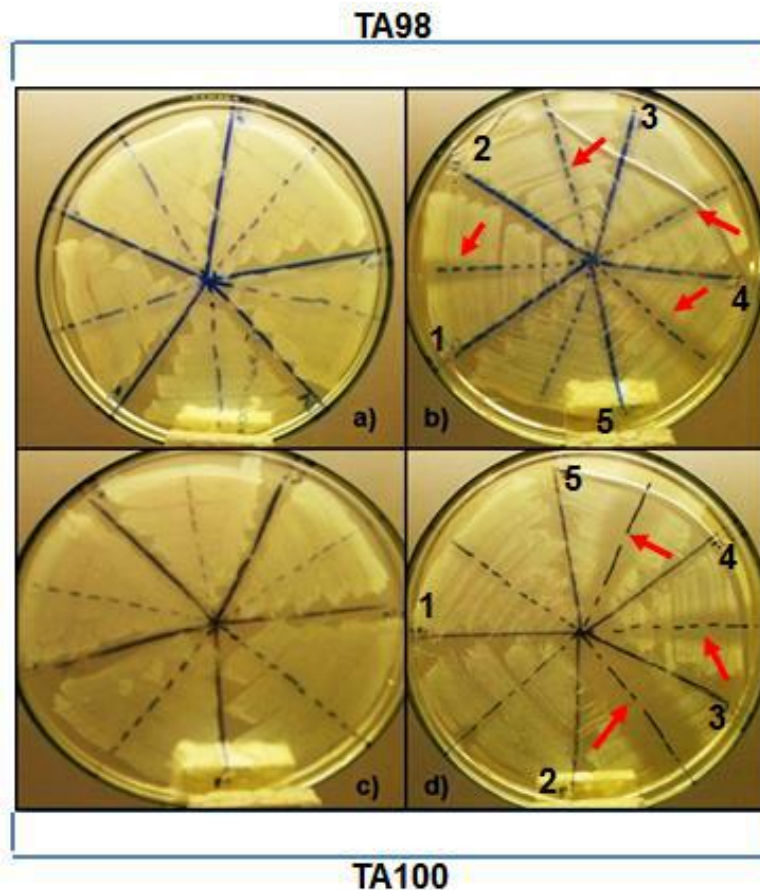


Figura 6: Avaliação da presença do plasmídeo pKM101 nas linhagens TA98 e TA100. Em a e c placas contendo meio suplementado com ampicilina; b e d placas controle contendo tetraciclina

Para a confecção dos estoques de trabalho e permanente de células foram escolhidas as colônias que obtiveram melhor desempenho nas provas genéticas levando em consideração também a taxa de reversão espontânea obtida (Tabela 6) em comparação com a taxa de reversão espontânea descrita na literatura (Tabela 5).

Para a linhagem TA98 a taxa de reversão espontânea descrita na literatura varia entre 20 – 50 e para a linhagem TA100 essa faixa varia de 75-200.

A colônia 5 da TA98 ficou dentro da faixa de reversão espontânea, no entanto, na prova genética para avaliação da presença do plasmídeo pKM101 ela não apresentou resultado totalmente satisfatório, uma vez que apresentou crescimento quando exposta à tetraciclina. Portanto, a próxima colônia com melhor desempenho e com taxa de reversão espontânea mais próxima da descrita na literatura foi a

colônia 4. Para a escolha da melhor colônia da linhagem TA100 o raciocínio lógico utilizado foi o mesmo e, portanto, as colônias escolhidas foram as de número 3, 4 e 5.

Tabela 6: Compilação dos resultados das provas genéticas das linhagens TA98 e TA100. (+) significa que houve crescimento bacteriano e (-) significa que não houve crescimento bacteriano

Características Genéticas								
TA98								
Colônia	Antibiótico		rfa (mm)	UV		his		Reversão espontânea Média
	Amp	Tet		I	NI	Com	Sem	
1	(+)	(-)	13	(-)	(+)	(+)	(-)	7
2	(+)	(-)	13	(-)	(+)	(+)	(-)	13
3	(+)	(-)	13	(-)	(+)	(+)	(-)	7
4	(+)	(-)	14	(-)	(+)	(+)	(-)	16
5	(+)	(+)	14	(-)	(+)	(+)	(-)	30
TA100								
1	(+)	(+)	15	(-)	(+)	(+)	(-)	74
2	(+)	(+)	15	(-)	(+)	(+)	(-)	73
3	(+)	(-)	15	(-)	(+)	(+)	(-)	94
4	(+)	(-)	17	(-)	(+)	(+)	(-)	87
5	(+)	(-)	15	(-)	(+)	(+)	(-)	80

5.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE MICROSSUSPENSÃO (TESTE DE KADO)

O Teste de Ames é a metodologia mais empregada ao redor do mundo para ensaios de triagem na avaliação de mutagenicidade de substâncias. Com o objetivo de conferir maior sensibilidade a mutágenos foi desenvolvida a metodologia de microsuspensão ou teste de Kado (KADO et al, 1983; MORTELMANS e AMES, 2000).

A validação da metodologia adotada por um laboratório, seja ela qual for, é de extrema importância para garantir a reprodutibilidade do teste e a confiabilidade dos resultados, sendo assim essa etapa foi extremamente importante no trabalho.

Para a validação foram utilizadas substâncias reconhecidamente mutagênicas

(Tabela 2), as quais garantiriam resultados verdadeiramente positivos.

Foram utilizadas as colônias 4 de ambas as linhagens (obtidas durante o preparo dos estoques) para a validação da metodologia. Os resultados do ensaio de validação encontram-se descritos nas Tabela 7 e 8.

Tabela 7: Validação do Teste de Kado para a linhagem TA98. Os traços representam ausência de crescimento na placa e foram portanto, desconsiderados do cálculo da média considerando estas doses somente como duplicata.

A

Dose 2NF (ng/placa)	TA98 (-S9)				Média	Desvio Padrão	RM
	Numero colônias/placa						
0	10	32	30	10	20,8	12,15	-
4,8	149	82	92		107,67	36,14*	5,18
7,5	339	162	205		235,33	92,32*	11,31
11,9	327	246	-		286,5	57,28**	13,77
18,8	389	233	-		311	110,31*	14,95
30	159	710	-		434,5	389,62	20,89
47	988	946	-		967	29,7**	46,49
Valor de p para dose-resposta						<0,001	
Valor de p para ANOVA						<0,001	
Valor de p Berstein						= 0,578	
Nota: * significância de 5%; **significância de 1%							

B

Dose 2AA (ng/placa)	TA98 (+S9)				Média	Desvio Padrão	RM
	Numero colônias/placa						
0	20	25	14	15	18,5	5,07	-
2	50	55	-		52,5	3,54**	2,84
3,2	94	120	-		107	18,38**	5,78
6	114	154	-		134	28,28**	7,24
7,9	177	262	295		244	60,88**	13,19
12,5	267	413	-		340	103,24*	18,38
19,8	464	418	-		441	32,53**	23,84
Valor de p para dose-resposta						<0,001	
Valor de p para ANOVA						<0,001	
Valor de p Berstein						= 0,3	
Nota: * significância de 5%; **significância de 1%							

Para a linhagem TA98 podemos observar que nos controles negativos, tanto na ausência (Tabela 7A) quanto na presença (Tabela 7B) do sistema de metabolização, a média do número de revertentes espontâneos por placa mostrou-se dentro ou muito próxima da faixa descrita na literatura (Tabela 5). É possível notar também que o sistema de metabolização funcionou perfeitamente durante o ensaio, uma vez que o 2-Aminoantraceno, substância que precisa ser metabolizada para exercer o seu efeito mutagênico, mostrou-se capaz de aumentar continuamente a taxa de reversão espontânea à medida que concentrações crescentes do mutágeno foram empregadas no teste (Tabela 7B).

A análise estatística foi realizada com o programa Salanal. Esse programa permite avaliar o efeito dose-resposta através do cálculo da análise da variância (ANOVA – teste F) entre as médias do número de revertentes nas diferentes doses testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. Foram considerados valores significativos os que apresentaram valores de $p < 0,05$, marcados com um asterisco, e muito significativos, marcados com dois asteriscos, os que apresentaram valores de $p < 0,01$.

Como pode ser observado ainda nas Tabelas 6A e B, o valor de p para dose resposta das amostras é menor que 0,001, podendo-se considerar positiva a relação dose-resposta em ambos os casos. A análise da variância indicou que existe diferença significativa entre os resultados obtidos das diferentes doses testadas ($p < 0,001$).

Os valores de p para o modelo utilizado para a análise dos dados, no caso o modelo Berstein, indicam que os dados obtidos com a linhagem TA98 na ausência do sistema de metabolização (Tabela 7A) estão mais ajustados em relação ao modelo escolhido do que os dados obtidos com esta mesma linhagem na presença do S9 (Tabela 7B), uma vez que o valor de P na ausência do S9 é maior.

O cálculo da razão de mutagenicidade (RM) para todas as doses analisadas de 2NF (Tabela 7A) e 2AA (Tabela 7B), que é a média do número de revertentes na placa teste (espontâneos mais induzidos) dividida pela média do número de revertentes por placa do controle negativo, mostrou valor maior do que 2 sugerindo a mutagenicidade das amostras utilizadas na validação do ensaio com a linhagem TA98.

Uma amostra é considerada mutagênica quando a RM for maior ou igual a 2, em pelo menos uma das doses testadas e, quando houver uma relação dose-resposta entre as doses testadas e o número de revertentes induzidos. Desta forma, as amostras utilizadas na validação do Teste de Kado com a linhagem TA98 são mutagênicas, uma vez que a RM de todas as doses testadas foi maior do que 2 e os valores de p das curvas dose-resposta e da análise de variância resultaram significativos (menores que 0,001).

Para a linhagem TA100 podemos observar que nos controles negativos, tanto na ausência (Tabela 8A) quanto na presença (Tabela 8B) do sistema de metabolização, a média do número de revertentes espontâneos por placa mostrou-se dentro da faixa descrita na literatura (Tabela 5). É possível notar também que o sistema de metabolização funcionou perfeitamente durante o ensaio, uma vez que o 2-Aminoantraceno, substância que precisa ser metabolizada para exercer o seu efeito mutagênico, mostrou-se capaz de aumentar continuamente a taxa de reversão espontânea à medida que concentrações crescentes do mutágeno foram empregadas no teste (Tabela 8B).

Como pode ser observado nas Tabelas 8A e B, o valor de p para dose resposta das amostras é menor que 0,001, podendo-se considerar positiva a relação dose-resposta em ambos os casos. A análise da variância indicou que existe diferença significativa entre os resultados obtidos das diferentes doses testadas ($p < 0,001$).

Tabela 8: Validação do Teste de Kado para a linhagem TA100. Os traços representam ausência de crescimento na placa e foram portanto, desconsiderados do cálculo da média considerando estas doses somente como duplicata.

A

Dose AZS (µg/placa)	TA100 (-S9)				Média	Desvio Padrão	RM	
	Numero colônias/placa							
0	93	87	79	89	82	86	5,57	-
0,1	126	169	143			146	21,66*	1,70
0,2	235	202	-			218,5	23,33**	2,54
0,3	298	234	-			266	45,25**	3,09
0,4	342	361	-			321,5	13,44**	3,74
0,45	240	387	-			313,5	103,94*	3,65
0,5	321	466	414			400,33	73,46**	4,66
Valor de p para dose-resposta							<0,001	
Valor de p para ANOVA							<0,001	
Valor de p Berstein							= 0,753	
Nota: * significância de 5%; **significância de 1%								

B

Dose 2AA (µg/placa)	TA100(+S9)				Média	Desvio Padrão	RM	
	Numero colônias/placa							
0	107	106	103	93	107	103,2	5,93	-
0,0062	169	195	160			174,67	18,18**	1,69
0,0198	265	302	-			283,5	26,16**	2,75
0,0627	440	416	355			403,67	43,82**	3,91
0,198	374	264	-			319	77,78*	3,09
0,625	222	169	-			195,5	37,48*	1,89
1,925	531	258	373			387,33	137,06*	3,75
Valor de p para dose-resposta							<0,001	
Valor de p para ANOVA							<0,001	
Valor de p Berstein							=0,301	
Nota: * significância de 5%; **significância de 1%								

Os valores de p para o modelo Berstein utilizado para a análise dos dados indicam que os dados obtidos com a linhagem TA100 na ausência do sistema de metabolização (Tabela 8A) estão mais ajustados em relação ao modelo escolhido do

que os dados obtidos com esta mesma linhagem na presença do S9 (Tabela 8B), uma vez que o valor de p na ausência do S9 é maior. Na tabela 8B estão os resultados da análise estatística considerando todas as doses da curva para esta linhagem com o sistema de metabolização, no entanto ao realizar a análise desconsiderando propositalmente os dados relativos às últimas três doses da curva desta linhagem na presença de S9 (0,198 ; 0,625; 1,925 μg) obtemos um valor de p de Berstein maior sendo este igual a 0,445. Essa retirada dos valores das doses é feita pelo próprio programa a fim de ajustar a análise ao modelo proposto.

O cálculo da razão de mutagenicidade (RM) para as doses analisadas de Azida Sódica (Tabela 8A) e 2AA (Tabela 8B) mostrou valor maior do que 2 para a maioria das doses sugerindo a mutagenicidade das amostras utilizadas na validação do ensaio com a linhagem TA100.

Os resultados confirmam que as amostras utilizadas na validação do Teste de Kado com a linhagem TA100 são mutagênicas, uma vez que a RM da maioria das doses testadas foi maior do que 2 e os valores de P das curvas dose-resposta e da análise de variância resultaram significativos (menores que 0,001).

5.3 APLICAÇÃO DO TESTE DE KADO PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE CHALCONAS SINTÉTICAS

5.3.1 Determinação das doses a serem avaliadas pelo Teste de Kado

As chalconas ou 1,3-diaril-2-propen-1onas, são compostos precursores da via biossintética dos flavonóides e isoflavonóides e diversos estudos já publicados caracterizaram diversas atividades farmacológicas como anti-inflamatória, antipirética, antimutagênica, antitumoral, citotóxica, antioxidante (SILVA, 2009), antibacteriana, antifúngica (CORDEIRO, 2010), antimalárica, antimetabólica, antiviral e antileishmania (FONSECA, 2012).

As chalconas 4 e 5 foram recentemente caracterizadas por sua ação anti-inflamatória e antimicobacteriana e sua eficácia comprovada em valores de CMI (Tabela 1) (VENTURA et al., 2015).

Para a determinação das doses de chalconas que seriam analisadas pelo Teste de Kado foi levado em conta os valores de CMI que constam na Tabela 1, uma vez que não seria interessante investigar valores muito acima ou muito abaixo das

CMI₅₀, pois os mesmos não seriam utilizados na prática clínica. Portanto, as doses de chalconas a serem testadas (Tabela 3) foram escolhidas de modo que cobrisse uma faixa com os valores de CMI₅₀ e CMI₉₀.

5.3.2 Avaliação da toxicidade das chalconas frente as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*

Como mencionado anteriormente, as chalconas 4 e 5 já foram caracterizadas por sua atividade bactericida e, em especial, a chalcona 5 tem atividade antibacteriana descrita para *Staphylococcus aureus* (SILVA et al., 2013). Portanto, antes da avaliação da mutagenicidade das mesmas pelo Teste de Kado, foi feita uma avaliação de uma possível toxicidade das chalconas 4 e 5 frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*.

Para essa análise foi empregada uma metodologia similar a usada em antibiogramas, colocando-se discos embebidos com soluções das chalconas nas concentrações de 15 30 e 300µM, no centro da sementeira. Um resultado positivo para ação bactericida ou toxicidade para as células seria visto caso aparecesse halo de inibição de crescimento bacteriano. Nas figuras 7, 8, 9 e 10 estão demonstrados os resultados destes ensaios. Em nenhuma concentração testada (em triplicata) foi observado halo de inibição de crescimento bacteriano concluindo-se, portanto, que as chalconas não apresentavam atividade tóxica para as linhagens utilizadas no ensaio. Como controle negativo foi usado DMSO diluído em água na mesma proporção em que foi utilizado para solubilizar as amostras contendo a maior concentração de chalconas.

Figura 7: Avaliação da toxicidade da chalcona 4 frente a linhagem TA98 de *Salmonella typhimurium*. Em a: placa controle com DMSO diluído; em b, c e d: discos embebidos com 15; 30 e 300 da C4, respectivamente

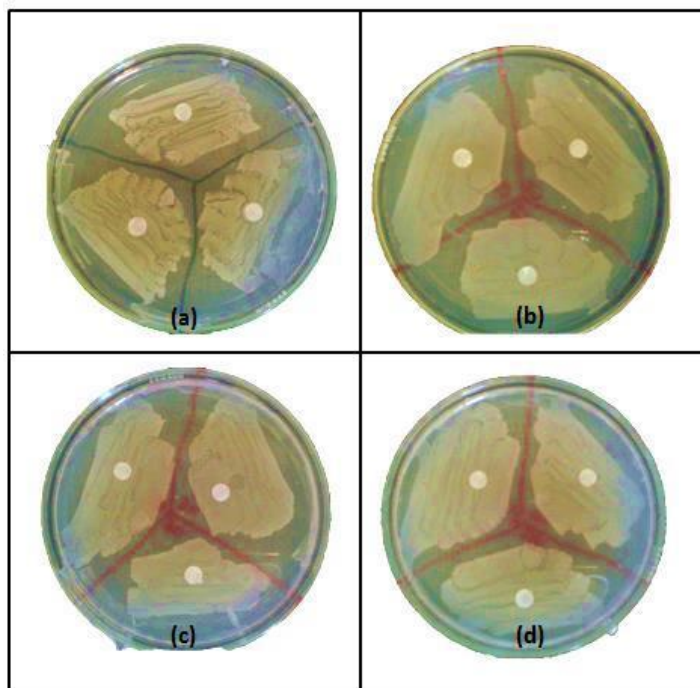


Figura 8: Avaliação da toxicidade da chalcona 5 frente a linhagem TA98 de *Salmonella typhimurium*. Em a: placa controle com DMSO diluído; em b, c e d: discos embebidos com 15; 30 e 300 μM da chalcona 5, respectivamente

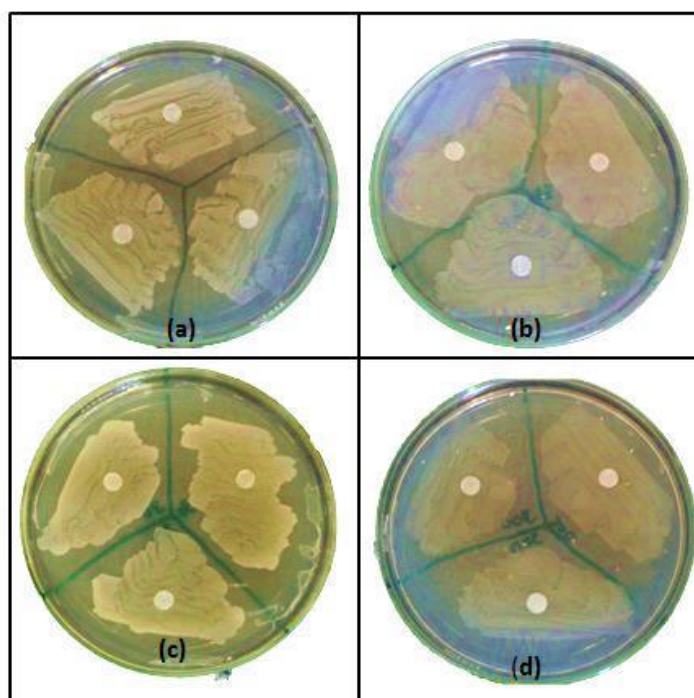


Figura 9: Avaliação da toxicidade da chalcona 4 frente a linhagem TA100 de *Salmonella typhimurium*. Em a: placa controle com DMSO diluído; em b, c e d: discos embebidos com 15; 30 e 300 μM da chalcona 4, respectivamente

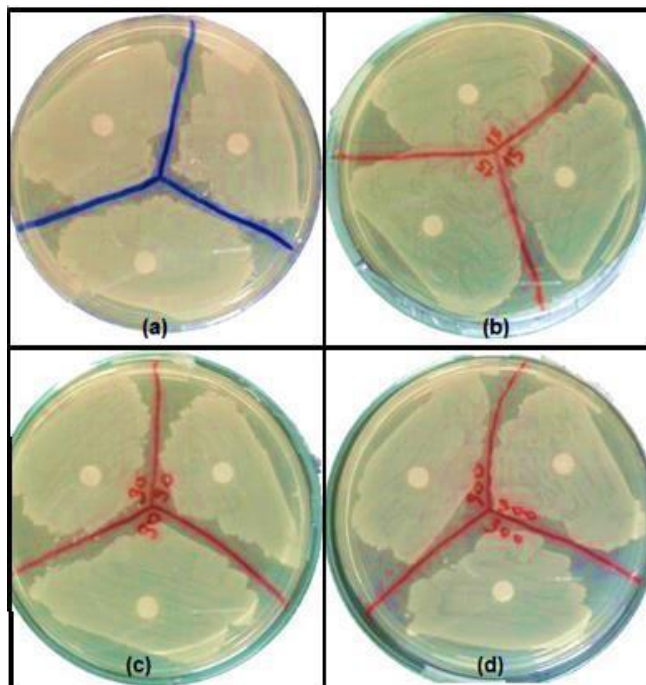
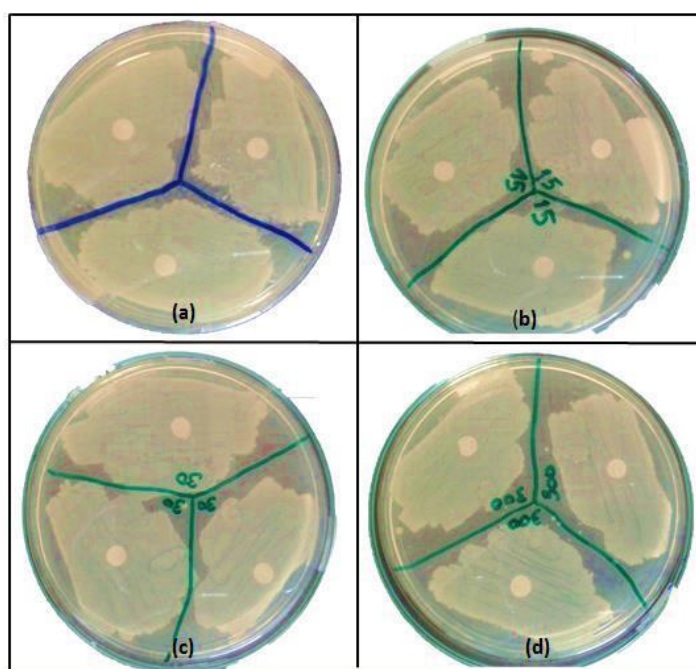


Figura 10: Avaliação da toxicidade da chalcona 5 frente a linhagem TA100 de *Salmonella typhimurium*. Em a: placa controle com DMSO diluído; em b, c e d: discos embebidos com 15; 30 e 300 μM da chalcona 5, respectivamente



5.3.3 Avaliação do potencial mutagênico das chalconas

A seguir é mostrado o número de colônias revertentes obtidas ao final do experimento de avaliação do potencial mutagênico da chalcona 4 na linhagem TA98 na ausência (Tabela 10A) e na presença do sistema de metabolização (Tabela 10B).

Tabela 9: Avaliação do potencial mutagênico da chalcona 4 na linhagem TA98

Chalcona 4																
A	Dose (µg/placa)	TA98 (-S9)				Média	RM	B	Dose (µg/placa)	TA98 (+S9)						
		Numero colônias/placa								Numero colônias/placa						
	0	10	17	15	25	16,4	-		0	17	20	14	17	11	15,8	-
	1,8	2	8	-	-	5	0,30		1,8	5	7	10	-	-	7,33	0,46
	0,56	13	15	-	-	14	0,85		0,56	-	-	-	-	-	-	0,00
	0,175	11	15	19	-	15	0,91		0,175	5	8	12	-	-	8,33	0,53
	0,05	18	18	19	-	18,3	1,12		0,05	7	11	-	-	-	9	0,57
	0,015	12	14	15	-	13,6	0,83		0,015	1	4	8	-	-	13	0,82
Controle positivo:						Controle positivo:										
2NF(0,15µg/placa) = 778;						2AA(0,625µg/placa) = 126;										
RM = 48,62						RM = 7,87										

A taxa média de reversão espontânea da linhagem TA98 tanto na presença quanto na ausência de S9 ficou próxima à faixa descrita na literatura. Os controles positivos responderam corretamente, apresentando ambos valores de RM muito maiores que 2. Além disso, o S9 funcionou perfeitamente ao metabolizar o 2AA para que o mesmo exercesse o seu efeito mutagênico (Tabela 10B). Na dose testada de 2-AA o mesmo apresentou um RM = 7,875, enquanto que o 2-NF, controle usado na ausência de S9, também se mostrou mutagênico com RM = 48,625 (Tabela 10A).

Cabe ressaltar, no entanto, que alguns problemas foram verificados nas placas deste experimento, ao final do tempo de incubação. Por exemplo, o número médio de colônias revertentes em algumas placas tratadas com a chalcona 4 mostrou um valor abaixo daquele verificado nas placas controle, o que sugere toxicidade da amostra para a linhagem TA98 em algumas concentrações analisadas, tanto na ausência quanto na presença do S9 (Tabelas 10A e 10B). A toxicidade só pode ser confirmada pela avaliação do background ou crescimento de fundo das placas sob um aumento de 40 vezes no microscópio óptico. O crescimento de fundo apresenta-se como um mar de micro colônias densamente agrupadas invisível a

olho nu que circunda, em situações normais, as colônias saudáveis, visíveis a olho nu, que crescem na placa. Quando a substância é tóxica para a bactéria esse background começa a perder a densidade ou simplesmente desaparece (MORTELMANS e AMES, 2000).

O tratamento da TA98 com a chalcona 4 na ausência do S9 resultou em colônias pequenas. Quando as placas foram analisadas microscopicamente somente as três menores doses (0,015, 0,05 e 0,175 μ g) apresentaram background satisfatório quando comparadas ao controle negativo. As placas submetidas ao tratamento com as duas doses mais altas de chalcona 4 não apresentaram crescimento de fundo.

Levando em consideração o exposto acima, foi efetuada a análise estatística somente com os dados oriundos das placas cujo tratamento com a chalcona 4 na ausência do S9 não mostraram indícios de toxicidade. A análise revelou que o valor de P para dose resposta das amostras é igual a 0,570, não havendo, portanto, uma relação dose-resposta neste caso. A análise da variância indicou que não existe diferença significativa entre os resultados obtidos das diferentes doses testadas ($P = 0,531$). Além disso, o cálculo da RM para as três doses mais baixas de chalcona 4 (dado não mostrado) mostrou valores menores que 2. Desta forma, este conjunto de resultados sugere que a chalcona 4, na faixa de concentração que varia de 15-175ng não se mostrou mutagênica.

Apesar dos resultados anteriores da avaliação da toxicidade das chalconas frente as linhagens de *Salmonella typhimurium* terem mostrado que a chalcona 4 não era tóxica (Figura 7), na presença do S9, a chalcona 4 se mostrou tóxica para as células bacterianas em todas as concentrações testadas, o que sugere que os metabólitos oriundos dessa substância são capazes de causar a morte da bactéria. Essa toxicidade é evidenciada pelo baixo número de colônias revertentes nas placas teste e ainda pela ausência parcial ou total de crescimento de fundo nas placas quando essas foram analisadas microscopicamente.

A seguir é mostrado o número de colônias revertentes obtidas ao final do experimento de avaliação do potencial mutagênico da chalcona 5 na linhagem TA98 na ausência (Tabela 11A) e na presença do sistema de metabolização (Tabela 11B).

Tabela 10: Avaliação do potencial mutagênico da chalcona 5 na linhagem TA98

Chalcona 5																
A	Dose ($\mu\text{g/placa}$)	TA98(-S9)				Média	RM	B	Dose ($\mu\text{g/placa}$)	TA98 (+S9)				Média	RM	
		Numero colônias/placa								Numero colônias/placa						
	0	10	17	15	25	15	16,4	-	0	17	20	14	17	11	15,8	-
	1,8	6	13	14			11	0,67	1,8	4	10	15			9,6	0,61
	0,57	6	-	-			6	0,37	0,57	5	7	10			7,3	0,46
	0,176	3	16	17			12	0,73	0,176	3	4	6			4,3	0,27
	0,05	6	17	-			11,5	0,70	0,05	2	2	-			2	0,13
	0,015	10	14	14			12,6	0,77	0,015	-	-	-			-	-
Controle positivo: 2NF(0,15 $\mu\text{g/placa}$)= 778; RM = 48,62							Controle positivo: 2AA(0,625 $\mu\text{g/placa}$)= 126; RM = 7,87									

Para a chalcona 5, na ausência de S9 (Tabela 11A) a mesma se mostrou tóxica para a bactéria nas doses de 0,57 $\mu\text{g/placa}$ e 1,8 $\mu\text{g/placa}$ e, conforme discutido para a chalcona 4, essa toxicidade foi confirmada pelos mesmos requisitos: número médio de colônias revertentes na placas tratadas com estas doses mostrou um valor abaixo daquele verificado nas placas controle e ausência de background. Nas demais doses, a chalcona 5 não se mostrou tóxica.

Levando em consideração o exposto acima, foi efetuada a análise estatística somente com os dados oriundos das placas cujo tratamento com a chalcona 5 na ausência do S9 não mostraram indícios de toxicidade. A análise revelou que o valor de p para dose resposta das amostras é igual a 0,706, não havendo, portanto, uma relação dose-resposta neste caso. A análise da variância indicou que não existe diferença significativa entre os resultados obtidos das diferentes doses testadas ($p = 0,749$). Além disso, o cálculo da RM para as três doses mais baixas de chalcona 5 mostrou valores menores que 2. Desta forma, este conjunto de resultados sugere que a chalcona 5, na ausência de ativação metabólica, na faixa de concentração que varia de 15-176 ng também não se mostrou mutagênica para a linhagem TA98.

Na presença de S9 a chalcona 5 se mostrou tóxica para a linhagem TA98 em todas as doses testadas (Tabela 11) o que impediu a avaliação da mutagenicidade da substância.

Tabela 11: Avaliação do potencial mutagênico da chalcona 4 na linhagem TA100

Chalcona 4											
A	Dose ($\mu\text{g/placa}$)	TA100 (-S9)			Média	RM	B	Dose ($\mu\text{g/placa}$)	TA100 (+S9)		
		Numero colônias/placa							Numero colônias/placa		
		103	100	108				103	100	108	
	0	102			104,2	-		0	102		
	1,8	54	-	-	54	0,52		1,8	105	112	116
	0,56	10	23	69	34	0,63		0,56	109	110	117
	0,175	-	-	-	-	0,00		0,175	85	89	99
	0,05	43	-	-	43	-		0,05	98	119	140
	0,015	109	-	-	109	2,53		0,015	137	137	139
Controle positivo: AZS (5,0 $\mu\text{g/placa}$) 131; RM = 1,25						Controle positivo: 2AA (0,625 $\mu\text{g/placa}$) 229; RM = 2,2					

Tabela 12: Avaliação do potencial mutagênico da chalcona 5 na linhagem TA100

Chalcona 5											
A	Dose ($\mu\text{g/placa}$)	TA100 (-S9)			Média	RM	B	Dose ($\mu\text{g/placa}$)	TA100 (+S9)		
		Numero colônias/placa							Numero colônias/placa		
		103	100	108				103	100	102	
	0	102			104	-		0	108		
	1,8	86	113	99	99	0,95		1,8	90	98	-
	0,57	77	101	81	86	0,83		0,57	68	69	98
	0,176	78	107	-	92	0,88		0,176	-	107	78
	0,05	68	69	98	78	0,75		0,05	77	81	101
	0,015	90	98	-	94	0,90		0,015	86	113	99
Controle positivo: AZS(5,0 $\mu\text{g/placa}$) 131; RM = 1,25						Controle positivo: 2AA (0,625 $\mu\text{g/placa}$) 229; RM = 2,2					

O número de revertentes espontâneos da linhagem TA100 ficou dentro da faixa descrita na literatura tanto na ausência quanto na presença de S9 (Tabelas 12 e 13). O controle positivo 2-AA respondeu adequadamente na dose testada apresentando uma RM = 2,2. No entanto, a azida sódica, controle positivo usado no ensaio na ausência de S9 não respondeu adequadamente (apresentou uma RM < 2), prejudicando assim a interpretação dos resultados obtidos pelo tratamento da linhagem TA100 com as chalconas 4 e 5 (Tabelas 12A e 13A) na ausência do sistema de metabolização. No entanto, é possível afirmar que a C4 na ausência do S9 (Tabela 12A) se mostrou tóxica para a linhagem TA100, uma vez que a maioria

das placas tratadas com a chalcona 4 mostrou um número médio de colônias revertentes abaixo daquele verificado nas placas controle. A toxicidade é corroborada pela ausência de background nas placas. A C5, por outro lado, não mostrou indícios de toxicidade para a linhagem TA100.

Uma vez que na presença do S9 a chalcona 4 não demonstrou indícios de toxicidade para a linhagem TA100 de *Salmonella typhimurium*, foi efetuada a análise estatística. A análise revelou que o valor de p para dose resposta das amostras é igual a 0,981, não havendo, portanto, uma relação dose-resposta neste caso. A análise da variância indicou que não existe diferença significativa entre os resultados obtidos das diferentes doses testadas ($p = 0,029$). Além disso, o cálculo da RM para todas as doses de chalcona 4 analisadas mostrou valores menores que 2. Desta forma, este conjunto de resultados sugere que a chalcona 4, na faixa de concentração que varia de 0,015-1,8 μg não se mostrou mutagênica para a linhagem TA100 na presença do S9.

A chalcona 5 não se mostrou tóxica nem mutagênica para a linhagem TA100 na presença do sistema de metabolização. A análise estatística revelou que o valor de p para dose resposta das amostras é igual a 0,271, não havendo, portanto, uma relação dose-resposta neste caso. A análise da variância indicou que não existe diferença significativa entre os resultados obtidos das diferentes doses testadas ($p = 0,153$). Além disso, o cálculo da RM para todas as doses de chalcona 5 testadas mostrou valores menores que 2. Desta forma, este conjunto de resultados sugere que a chalcona 5, na faixa de concentração que varia de 0,015-1,8 μg também não se mostrou mutagênica para a linhagem TA100 na presença do S9.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na avaliação das características genéticas das linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* permitiram o preparo correto e eficaz do estoque de células de trabalho e permanente.

Com a utilização de substâncias reconhecidamente mutagênicas na validação da metodologia de microssuspensão (Teste de Kado) foram obtidos, na maioria das doses empregadas, RM maiores ou igual a 2 o que demonstra que a técnica empregada bem como todos os sistemas envolvidos funcionaram adequadamente, corroborando para a completa implantação do Teste de Ames.

Na avaliação do potencial mutagênico das chalconas sintéticas, as mesmas se mostraram consideravelmente citotóxicas para algumas doses testadas nas linhagens tanto na ausência quanto na presença do sistema de metabolização o que impede que qualquer resultado definitivo seja tomado.

Portanto, as chalconas devem ser submetidas a novos experimentos com doses menores além de outras linhagens testadoras para confirmar os dados obtidos nesse trabalho.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para condução de estudos não-clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessária ao desenvolvimento de medicamentos. Versão 2. Brasília, 2013

AMES, B.N. A combined bacterial and liver test system for detection and classification of carcinogens as mutagens. *Genetics*.V.78, p91-95. 1974

AMES, B.N., SHIGENAGA, M.K., GOLD.L.S. DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: Three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. 1993

CLAXTON, L.D., UMBUZEIRO,G.A., MARINI,D.M. The *Salmonella* Mutagenicity Assay: The stethoscope of Genetic Toxicology for the 21st Century. *Environmental Health Perspectives*.V.1, n.11, p1515-1522. 2010

COOPER,G.M e HAUSMAN,R.E. Fundamentos da biologia molecular. A célula – uma abordagem molecular. Editora Artmed. 3^a edição.p. 89-134, 2007a, reimpressão 2009

COOPER,G.M e HAUSMAN,R.E. O fluxo da informação genética. A célula – uma abordagem molecular. Editora Artmed. 3^a edição.p. 139-316, 2007b, reimpressão 2009

CORDEIRO,M.N.S. Síntese e caracterização de Chalconas derivadas da 3,4,5-Trimetoxiacetofenona com potencial atividade antileucêmica. Tese de Doutorado.Universidade Federal de Santa Catarina. 2010; Disponível em <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/eco/002826/02826-23.pdf>; Acesso em 21 de Abril de 2015

DUBICK, M.A. Historical perspectives on the use of herbal preparations to promote health. *The Journal of Nutrition*. v.116, n.7, p.1348-1354, 1986

Farmacopéia Brasileira. Metodologia para o teste de sensibilidade aos antibacterianos (antibiograma). 4^a Edição. 1988

FONSECA, C.A., PEREIRA,D.G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. *Infarma*. V.16. n.7/8, p.51-54, 2004

FONSECA, P.S. Síntese e caracterização de chalconas e dichalconas contndo unidades 1,2,3-triazólicas. Dissertação de Doutorado. Universidade de Brasília. 2012

GRIFFITHS,A.J.F., WESSLER,S.R., CAROLL, S.B., DOEBLEY,J. Mutaçãõ, reparo e recombinaçãõ. Introdução à genética. Editora Gen. 10^a Edição. p.480. 2013

GUACHALLA,L., ASCARRUNZ, M.E. La Genética Toxicología: Uma ciência em constante desarrollo. *BIOFARBO*. V.11, p.75-82, 2003

KADO,N.Y., LANGLEY,D., EISENSTADT,E. A Simple modification of the Salmonella liquid incubation assay increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutation Research*. v.121, p25-32, 1983

KLUG, W.S., CUMMINGS, M.R., SPENCER, C.A., PALLADINO, M.A. Introdução à genética. Conceitos sobre genética. Editora Artmed. 9ª edição. Cap.1, p.2-17, 2010

KOLATA,G.B. Chemical Carcinogens: Industry Adopts Controversial “Quick” Tests. *Science*. v.192, n.4245, p. 1215-1217. 1976

LOUREIRO,A.P.M., DI MASCIO, P., MEDEIROS, M.H.G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: Implicações em mutagênese e carcinogênese. *Química Nova*. v.25, n.5, p.777-793, 2002

MARON,D.M., AMES.B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*.V.113, p173-215. 1983

MORTELMANS, K., ZEIGER,E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay.*Mutation Research*.V.455, p26-60. 2000

Organization for Economic Co-operation and development (OECD). Bacterial Reverse mutation test. Test Guideline 471. 1991

RABELLO-GAY, M.N. Genética Toxicológica: Bases e Metas. Instituto Butantan. Reverse mutation test. Test Guideline 471. 1991

RABELLO-GAY, M.N. Mutagênese e carcinogênese de substâncias químicas. *Ecotoxicología y seguridad química*. p. 329-34. 1987

RIBEIRO, L. R., MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. *Mutagênese Ambiental*. Ed. ULBRA. p. 21-26, 2003

ROCHA,L,W. Avaliação do potencial anti-hiperalgésico de chalconas bioativas frente a diferentes modelos experimentais de dor persistente em camundongos. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Itajaí. 2011

SILVA,W.A. Estudos da redução assimétrica de Iminas e Chalconas. Síntese de compostos com potencial ação farmacológica/tecnológica.Dissertação de Doutorado. Universidade de Brasília. 2009

SIVAKUMAR, P. M.; SEENIVASAN, S. P.; KUMAR, V.; DOBLE, M. Synthesis, antimycobacterial activity evaluation, and QSAR studies of chalcones derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. v.17, p.1695-1700, 2007

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. *Ci. Biol/Saúde*. V.18/19, n. 2, p.41-50. 1999

UMBUZEIRO,G.A., RECH,C.M., CORREIA,S., BERGAMASCO, A.M., CARDENETTE,G.H.L., ISLER-FLUCKIGER,S, KAMBER,M. Comparision of the Salmonella/Microsome Microsuspension Assay with the new Microplates Fuctuation Protocol for testing mutagenicity of environmental samples. Environmental and Molecular Mutagenesis. 2009

UMBUZEIRO,G.A., VARGAS, V.M.F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. Mutagênese Ambiental. Ed. ULBRA. p.81-112, 2003

VENTURA, T. L. B.; CALIXTO, S. D.; ABRAHIM-VIEIRA, B. A.; DE SOUZA, A. M. T.; MELLO, M. V. P.; RODRIGUES, C. R.; MIRANDA, L. S. M.; SOUZA, R. O. M. A.; LEAL, I. C. R.; LASUNSKAIA, E. B.; MUZITANO, M. F. Antimycobacterial and anti-inflammatory activities of substituted chalcones focusing on an anti-tuberculosis dual treatment approach. *Molecules*. v.20, p.8072-8093, 2015

WATSON,J.D., BAKER,T.A., BELL.S.P., GANN,A., LEVINE,M., LOSICK,R. Mutabilidade e Reparo do DNA.Biologia Molecular do Gene. Artmed. 5ª edição. p.235-258, 2006

