



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA**

**Daniel Derrossi Meyer**

**UTILIZAÇÃO DO ENSAIO *SALMONELLA*/MICROSSOMA EM  
AMOSTRAS DE SOLO NO SUL DO BRASIL: TRÊS POTENCIAIS  
ÁREAS DE REFERÊNCIA**

Porto Alegre  
2008

**Daniel Derrossi Meyer**

UTILIZAÇÃO DO ENSAIO *SALMONELLA*/MICROSSOMA EM  
AMOSTRAS DE SOLO NO SUL DO BRASIL: TRÊS POTENCIAIS ÁREAS  
DE REFERÊNCIA

Monografia apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Ênfase Ambiental. Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Maria Hartz, Depto de Ecologia, Instituto de Biociências, UFRGS.

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vera Maria Ferrão Vargas, Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM) e Programa de Pós-Graduação em Ecologia, UFRGS.

Porto Alegre

2008

**“A teoria sempre acaba, mais cedo ou mais tarde, assassinada pela experiência.”**

**(Albert Einstein: 1879 – 1955)**

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Sandra Maria Hartz, pela oportunidade de realizar este trabalho;

À minha co-orientadora Vera Maria Ferrão Vargas, pelo grande aprendizado que tive;

Ao MSc. Flávio Manoel Rodrigues da Silva Júnior, em me ajudar a resolver os problemas na pesquisa, principalmente nos momentos de imprevisto, mesmo a quilômetros de distância;

À Márcia Isabel Käffer, por toda a ajuda prestada nas coletas de solo, inclusive a burocrática;

À Jocelita Aparecida Vaz Rocha, por todo o auxílio na parte química do projeto;

À MSc. Mariana Vieira Coronas e à futura bióloga Andréia Torres de Lemos, pela excepcional ajuda durante a realização dos bioensaios;

Aos demais colegas de laboratório da FEPAM (Ana, Willian, Guilherme, Caroline, Simone, Thati Cappi, Tati SP, Monice), que me ajudaram, de uma forma ou de outra, a concluir este trabalho;

A todo o pessoal do laboratório de Química da UFRGS e da Agronomia, pelas análises realizadas;

Às instituições de fomento (FAPERGS e CNPq), que foram vitais para o desenvolvimento da pesquisa;

À minha namorada, Michele Morales dos Santos, pelo incentivo e por sempre acreditar em mim.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho. Muito obrigado!

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparação das Respostas Mutagênicas para Extrato Lixiviado (São Jerônimo e Sítio 1).....	18
Figura 2: Citotoxicidade para a Linhagem TA98 de <i>Salmonella typhimurium</i> em Fração Lixiviada.....	21

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação das Respostas Mutagênicas para Extrato Lixiviado (Triunfo e Sítio 2).....	19
Tabela 2: Respostas Mutagênicas para Extrato Lixiviado (Itapuã).....	19
Tabela 3: Tabela 3: Índice de Mutagênese (IM) das Áreas Avaliadas para Referência.....	20
Tabela 4: Concentração de Nove Metais, Submetidos à Extração Lixiviada (pH = 4,93 ± 0,05).....	22

## SUMÁRIO

<b>Agradecimentos.....</b>	<b>4</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>5</b>
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>6</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>8</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>9</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>13</b>
Áreas de Estudo.....	13
Amostras de Solo.....	13
Preparação da Amostra.....	13
Extração da Fração Inorgânica (Lixiviada).....	13
Quantificação dos Metais.....	14
Ensaio de Mutagenicidade.....	14
<b>Resultados .....</b>	<b>16</b>
<b>Discussão .....</b>	<b>23</b>
<b>Conclusões .....</b>	<b>25</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>26</b>

## RESUMO

O ensaio *Salmonella*/microsoma tem sido cada vez mais empregado, como biomarcador, para avaliar a qualidade de compartimentos ambientais, sendo importante para o diagnóstico de alterações precoces no DNA. Diversas fontes poluidoras têm produzido e liberado cada vez mais resíduos de produtos tóxicos para o ambiente, dentre eles os metais pesados. No solo, alguns metais, em baixas concentrações, são essenciais para os seres vivos. Contudo, em quantidades excessivas, eles podem causar efeitos mutagênicos, carcinogênicos e/ou teratogênicos para a biota presente. Para avaliar o grau de contaminação, a utilização de áreas de referência se constitui uma importante ferramenta na comparação entre ambientes poluídos e não-poluídos. O presente estudo tem como objetivo buscar áreas de referência para diagnóstico da presença de substâncias mutagênicas de origem inorgânica (metais pesados) em amostras de solo. Duas áreas adjacentes a locais com estudos prévios de contaminação por substâncias mutagênicas foram selecionadas: a mata ciliar do Rio Jacuí à montante de uma usina termelétrica a carvão (SÃO JERÔNIMO) e um campo próximo a um sítio contaminado por preservantes de madeira (TRIUNFO), além de uma terceira área, localizada dentro de uma unidade de conservação, sem um histórico de contaminação (ITAPUÃ, Viamão), no Rio Grande do Sul. Empregou-se o ensaio *Salmonella*/microsoma, método de microsusensão, utilizando linhagens que detectam substituição de pares de bases (TA100) e erro no quadro de leitura (TA98 e TA97a) do DNA, em presença e ausência de metabolização hepática de ratos (fração S9). Analisaram-se extratos da fração lixiviada (pH  $4,93 \pm 0,05$ ), buscando avaliar respostas mutagênicas a partir de metais pesados. A área de TRIUNFO apresentou respostas mutagênicas indiretas para a fração lixiviada e caracterização química similares ao sítio contaminado por preservantes de madeira. No entanto, a prevalência de resultados negativos para SÃO JERÔNIMO e ITAPUÃ sugere a utilização desses dois locais como referência para solos sob suspeita de contaminação por metais pesados, em áreas que apresentem características biogeoquímicas ou ocupacionais similares. Dessa forma, associando a caracterização química com as respostas negativas para mutagenicidade, é possível contribuir na triagem e na definição de valores referenciais de mutagênese e de concentração de metais pesados nos solos no Sul do Brasil.

**Palavras-chave:** Áreas de referência, metais pesados, *Salmonella*/microsoma, mutagênese.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se empregado cada vez mais o ensaio *Salmonella*/microsoma, como biomarcador, para avaliar a qualidade de compartimentos ambientais, como ar, água, sedimento e solo. Esse método tem sensibilidade, a ponto de diagnosticar precocemente fontes de agentes agressivos ao DNA, definindo riscos potenciais a organismos de diferentes ecossistemas, incluindo o homem (SHEN, 2003; OHE *et al.*, 2004; WHITE & CLAXTON, 2004). A presença desses agentes contaminantes com comprovada ação mutagênica de origem antrópica no ambiente acarreta preocupação crescente quanto à sua origem, identificação, distribuição, interações nos ecossistemas e impacto nos seres vivos. A mobilidade, as concentrações e as transformações das substâncias nos diferentes compartimentos ambientais são definidas por suas propriedades físico-químicas, pelas propriedades físicas, químicas e biológicas do ecossistema e pelas fontes e descargas existentes. O diagnóstico dos efeitos sobre os organismos deve levar em consideração a natureza complexa dos estressores e as múltiplas rotas de exposição (REEVE, 2006).

A avaliação da atividade mutagênica de poluentes ambientais é uma etapa importante no diagnóstico de alterações ambientais precoces (VARGAS *et al.*, 2001; VARGAS, 2003; CORONAS *et al.*, 2008). Os bioensaios, empregando microorganismos, para medir mutagênese de substâncias químicas, avaliam a sua ação diretamente no material genético, permitindo associar efeitos para diferentes organismos. O ensaio *Salmonella*/microsoma utiliza linhagens bacterianas específicas para diagnosticar a natureza da ação mutagênica molecular, possibilitando, ainda, associar a fração de metabolização hepática P-450 de ratos *in vitro*, estimando os efeitos genotóxicos indiretos para organismos superiores. Estudos associando o fracionamento químico de amostras ambientais, como o material particulado do ar, amostras de água e sedimento de rios, além de solos contaminados, têm permitido diagnosticar o tipo de evento gerado por grupos químicos presentes na mistura (VARGAS *et al.*, 1995; 2001; 2003; TAGLIARI *et al.*, 2004; HORN *et al.*, 2004; CARDOZO *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2007), em consonância com a literatura internacional (OHE *et al.*, 2004; WHITE & CLAXTON, 2004). Sem sombra de dúvida, o ensaio *Salmonella*/microsoma é o mais empregado em pesquisas de Mutagênese Ambiental, particularmente para as análises de misturas complexas em amostras de rios e particulados atmosféricos (CLAXTON, 1983; ALFHEIM *et al.*, 1984; KIER *et al.*, 1986; LEWTAS, 1988; WATERS *et al.*, 1990; DeMARINI, 1991; LEWTAS *et al.*, 1992; VARGAS *et al.*, 1993; DeMARINI, 1994; CLAXTON, 1997; DeMARINI, 1998; CLAXTON & GEORGE, 2002; VARGAS, 2003),

embora um menor número de trabalhos seja relacionado a amostras de solo (DONNELLY *et al.*, 1988, 1991, 1993, 1995; McDANIELS *et al.*, 1993; HUGHES *et al.*, 1998).

Uma consequência da industrialização é a possibilidade de geração e de liberação de resíduos de produtos tóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e/ou teratogênicos no ecossistema. Embora muitos desses resíduos sejam liberados na atmosfera e na hidrosfera, uma boa parte do descarte em solos, seja intencional seja acidentalmente, contribui para a contaminação direta da superfície desse compartimento e dos aquíferos subterrâneos (WHITE & CLAXTON, 2004; SILVA-JUNIOR & VARGAS, 2008).

Além da contaminação pontual do solo, poluentes liberados para a atmosfera eventualmente podem ser acumulados na camada superficial desse compartimento, de acordo com as rotas de dispersão atmosférica de determinadas fontes poluidoras. Por esse motivo, mesmo para áreas sem um histórico de contaminação evidente, é necessário que a superfície do solo seja monitorada ambientalmente, a fim de avaliar a poluição de mutágenos e de carcinógenos que possam se acumular nesse local (WATANABE, 2008). Uma parte significativa da liberação dos compostos químicos no ambiente tem por destino final a superfície do solo (COURTY *et al.*, 2008), sendo que a maior parte dos contaminantes com comprovada ação mutagênica, que atinge o solo, acumula-se na sua camada mais superior (EDENHANDER *et al.*, 2000). Inclusive, é nessa mesma camada que grande parte das atividades biológicas ocorre, aumentando a interação do mutágeno com a biota presente.

O solo, por sua vez, é um meio dinâmico e complexo que se constitui de um agregado de minerais e de matéria orgânica, produzido por uma combinação complexa de processos físicos, químicos e biológicos (DONNELLY *et al.*, 1994; WINERGARDNER, 1995), sendo suas propriedades espaciais e temporariamente variáveis, dependentes dos efeitos combinados do clima, da atividade biológica, da topografia e da composição mineralógica da rocha-mãe (BRADY, 1974 & WINEGARDNER, 1995). Modificações na textura do solo, conteúdo de água, natureza e quantidade de matéria orgânica e um conjunto de outras variáveis, como consistência, porosidade, permeabilidade, compressibilidade, estado de oxidação, forma e carga da partícula e capacidade de mudança de carga, resultam em uma variação das propriedades físico-químicas atuantes em cada tipo de solo (DRAGUN, 1998).

O solo, dessa forma, apresenta características ímpares, diferindo dos outros compartimentos ambientais, no que diz respeito à retenção de poluentes, à medida que inexistente um deslocamento contínuo, podendo acarretar o aumento do tempo de permanência dos contaminantes em nível local (SILVA-JÚNIOR & VARGAS, 2007). Todas essas considerações são importantes, uma vez que diferenças no tipo do solo podem produzir

efeitos ambientais sinérgicos e aumentar a genotoxicidade a partir dos poluentes presentes. A argila, por exemplo, tendo carga negativa, tem capacidade de reter íons com cargas positivas, principalmente, compostos inorgânicos, como os metais pesados e, quando estes são acumulados em quantidades expressivas, podem ser tóxicos para a biota presente (WHITE & CLAXTON, 2004). A argila e a matéria orgânica são importantes componentes do solo, tendo o papel de adsorver contaminantes inorgânicos, alterando a toxicidade, uma vez que reduzem a biodisponibilidade e o risco de exposição aos xenobióticos no ecossistema (DONNELLY *et al.*, 1994).

Entre os compostos inorgânicos com atividade mutagênica comprovada estão algumas espécies de metais pesados. Esse grupo de compostos compreende elementos com número atômico entre 21 (Escândio) e 84 (Polônio), incluindo o Alumínio, o Selênio e o Arsênio (números atômicos 13, 33 e 34, respectivamente) (SCHNOOR, 1996). Eles ocorrem em ambientes naturais em baixas concentrações e muitos são essenciais para os seres vivos; em quantidades excessivas, contudo, podem-se transformar em agentes tóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e/ou teratogênicos (TSALEV & ZAPRIANOV, 1984; WONG, 1988; ROSSMAN *et al.*, 1991;). Ainda, apresentam risco de exposição à saúde humana e ao meio ambiente, quando em espécies biodisponíveis, não só por sua estrutura química, mas também dependente do somatório de suas concentrações (PICHTEL *et al.*, 1998). Fontes de metais pesados podem ser emitidas pela poeira da atmosfera, resíduos de efluentes industriais, fertilizantes, mineração e por outros resíduos de materiais despejados no solo (FERGUSON, 1990; WESP *et al.*, 2000; ESTEVE-NÚÑES *et al.*, 2001; GILMORE, 2001). Além disso, diminuem sua concentração à medida que aumenta a profundidade do solo (LAGERWERFF & SPECHT, 1970; PATERSON *et al.*, 1996; SUTHERLAND & TOLOSA, 2001). Os metais pesados são analisados em água bruta ou solubilizados de amostras sólidas, associados à caracterização das frações biodisponíveis de interesse na área (SILVA JÚNIOR & VARGAS, 2007). A interação íon metal-DNA tem sido amplamente investigada, no que diz respeito à indução de danos ao material genético. Há quatro locais em potencial para os metais se associarem ao DNA: 1) na carga negativa dos átomos de oxigênio do grupo fosfato, (2) na hidroxila da ribose, (3) nas bases nitrogenadas e (4) na base exocíclica dos grupos ceto. No entanto, a maioria dos metais de transição interage com mais de dois diferentes sítios e suas interações com o DNA se tornam, portanto, mais complexas (OLIVEIRA, 2008).

Sendo assim, com a presença crescente e contínua de fontes poluidoras, torna-se cada vez mais difícil encontrar locais livres de contaminação antrópica, como áreas preservadas e isoladas de atividade humanas. Esses locais, denominados de áreas de referência, contribuem

para o diagnóstico de sítios contaminados. Para selecionar essas áreas de referência, é necessário considerar, além das características físicas da região, como geologia, composição do solo, dispersão atmosférica, hidrologia e relevo, o seu grau de isolamento e de preservação, quanto à influência antrópica direta ou indireta. Além disso, associar as informações obtidas por intermédio das frações químicas das amostras, com comprovado potencial mutagênico, aos ensaios de mutagenidade é fundamental para definir valores referências para contaminantes inorgânicos, como os metais pesados, em amostras de solo. Esses dados, portanto, podem servir de parâmetro para sítios contaminados em condições similares.

Alguns autores tentam classificar áreas amostradas para a mutagenicidade no solo em três categorias: (1) industriais, (2) urbanas/suburbanas e (3) áreas agricultáveis/rurais, existindo uma diferença significativa entre cada uma dessas categorias e suas respectivas respostas mutagênicas (WHITE & CLAXTON, 2004); outro estudo dividiu em cinco categorias (1) áreas industriais, (2) áreas urbanas, (3) áreas suburbanas, (4) solos agricultáveis, com interferência de contaminação química e biológica, pesticidas, fertilizantes e (5) áreas naturais e florestais, as quais não deveriam estar contaminadas. No entanto, essa última categoria pode-se submeter a outras fontes de contaminação, como dispersão atmosférica, transferência de água por enchentes ou resíduos dispersos (COURTY *et al.*, 2008).

O presente estudo tem como objetivo buscar áreas de referência para diagnóstico da presença de substâncias mutagênicas de origem inorgânica (metais pesados) em amostras de solo, realizando a caracterização química dos metais pesados e relacionando-a com as respostas mutagênicas dos ensaios biológicos realizados.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **ÁREAS DE ESTUDO**

Três potenciais áreas de referência foram avaliadas: duas próximas a locais com estudos prévios de contaminação: 1- mata ciliar do Rio Jacuí à montante de uma usina termelétrica a carvão (SÃO JERÔNIMO, RS), com coordenadas 29° 57' 31''S e 51° 45' 34''O, com distância entre os pontos de 2,74 Km (SILVA-JUNIOR & VARGAS, 2007); 2- campo próximo a sítio contaminado por preservantes de madeira, próximo ao Rio Taquari (TRIUNFO, RS), com coordenadas 29° 52' 19''S e 51° 42' 48''O, separados por 1,2 Km (processo licenciatório da FEPAM); 3- localizada dentro de uma unidade de conservação, sem um histórico de contaminação (ITAPUÃ), localizada em VIAMÃO, RS, com coordenadas 30° 20' 10''S e 51° 02' 02'' O, no Rio Grande do Sul, Brasil.

### **AMOSTRAS DE SOLO**

As amostras de solo foram coletadas em outubro de 2007 (TRIUNFO, RS), em novembro de 2007 (SÃO JERÔNIMO, RS) e em junho de 2008 (ITAPUÃ) a uma profundidade de 0 a 20 cm, sendo o excesso de resíduos vegetais removido. As amostras foram coletas com espátulas de inox e acondicionadas a 4°C em frascos de vidros, protegidos da luz.

### **PREPARAÇÃO DA AMOSTRA**

No laboratório, o solo coletado foi seco à temperatura ambiente e protegido da luz. Posteriormente, peneirado em malha de 2.0 mm e acondicionado, imediatamente, a 4°C até a extração (protegido da luz).

### **EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO INORGÂNICA (LIXIVIADA)**

As amostras de solo foram submetidas ao procedimento de mesa agitadora (*shaker*), com rotação de 115 rpm a 20°C, por 24 horas, em solução de 5,7 mL de ácido acético p.a. (SILVA-JUNIOR & VARGAS, 2007) e 64,3 mL de hidróxido de sódio 1,0 M p.a.,

preparadas em 1000 mL de água deionizada ( $\text{pH } 4,93 \pm 0,05$ ); a proporção de solo e de solvente foi de 1:2, g/mL de acordo com os padrões brasileiros (NBR 10005) (ABNT, 2004) ou água destilada (seguindo os mesmos procedimentos) e, então, centrifugadas a  $13.000 \times g$  por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , filtradas ( $0,45 \mu\text{m}$  Millipore), a fim de extrair metais pesados a partir da fração lixiviada. O extrato foi armazenado a  $4^\circ\text{C}$  por até 24 horas para avaliação de mutagenicidade.

## QUANTIFICAÇÃO DOS METAIS

A quantificação dos metais em extrato ácido (Mn, Fe, Al, Zn, Cu, Cd, Pb, Cr e Ni) foi realizada por plasma acoplado ao espectrômetro de emissão óptica (ICP – OES). As determinações dos metais foram realizadas no Laboratório de Solos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, de acordo com a metodologia recomendada por EPA (EPA, 2007).

## ENSAIO DE MUTAGENICIDADE

Foi empregado o ensaio *Salmonella*/microsoma, método de microsuspendição (KADO *et al.*, 1983; UMBUZEIRO & VARGAS, 2003), utilizando linhagens da bactéria *Salmonella typhimurium*, auxotróficas para histidina (histidina-dependentes), incapazes de crescer em meio mínimo, a menos que ocorram mutações que restaurem a síntese desse aminoácido. A frequência de mutação reversa é facilmente medida pela contagem de colônias que crescem em meio mínimo após a exposição de uma população de células a um agente mutagênico. Muitas linhagens foram construídas para detectar diversos tipos de mutações reversas, como substituição de pares de bases (TA100) e erro no quadro de leitura (TA98 e TA97a) do DNA, além de apresentarem sensibilidade a metais pesados (TA97a) (PAGANO & ZUGER, 1992). Os ensaios foram realizados em presença e em ausência de fração microsomal de fígado de rato (P-450), com adição de cofatores (S9 mix) (MARON & AMES, 1983).

Para cada amostra, o extrato da fração lixiviada (solução ácida  $\text{pH } 4,93 \pm 0,05$ ) foi analisado em seis diferentes dosagens: 25, 50, 75, 100, 150, 200 mg equivalentes de solo, em duplicatas. Nos diferentes ensaios, foram utilizados controles negativos (100  $\mu\text{l}$  de meio nutritivo líquido e 100  $\mu\text{l}$  de solução de ácido acético,  $\text{pH } 4,93 \pm 0,05$ , para o extrato da fração lixiviada) e controles positivos específicos para cada linhagem (25  $\mu\text{l}$  de 2AF para TA98,

TA97a e TA100 na presença de fração S9 mix; 25 µl de 4NQO para TA98 e TA97a, 50 µl de AZS para TA100, na ausência de fração S9 mix).

As diferentes dosagens das amostras e controles foram incubadas com 100 µl da linhagem teste em cultura *overnight* em presença de 100 µl de S9 mix, com a finalidade de avaliar a resposta mutagênica indireta, ou 100 µl de tampão fosfato 0,1 M (ausência de ativação metabólica), a fim de avaliar a resposta mutagênica direta. Após 90 minutos de incubação a 37°C, o conteúdo foi espalhado em ágar de superfície, contendo traços de biotina e de histidina, e semeado em Placa de *Petri*. Estas foram incubadas a 37°C por 72h, sendo, após, contado o número de colônias revertentes por placa.

Para o ensaio de citotoxicidade, foi realizado um teste de sobrevivência celular, tendo como padrão a linhagem TA98 (cultura de bactérias + S9 mix ou tampão fosfato (0,1M) + solvente ou extrato). A solução de teste foi diluída na concentração de  $1-2 \times 10^2$  células, semeada em placa com meio ágar nutriente e incubada por 72h a 37°C. As amostras que apresentaram um percentual inferior a 60% de sobrevivência das células em, pelo menos, uma das dosagens, foram consideradas citotóxicas, quando comparadas com o controle negativo.

A significância da curva dose-resposta para mutagênese foi avaliada no *software* SALANAL (*Salmonella Assay Analysis*, versão 1.0 of Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA), priorizando a regressão linear dos dados obtidos e estimando o valor de revertentes por grama de solo analisado (BERNSTEIN *et al.*, 1982). A resposta deve ser considerada mutagênica quando a regressão apresentar positividade significativa e se, em pelo menos uma dosagem, for observado o dobro dos valores de mutagênese espontâneos. Se apenas um desses critérios for detectado, a resposta deve ser considerada indicativa.

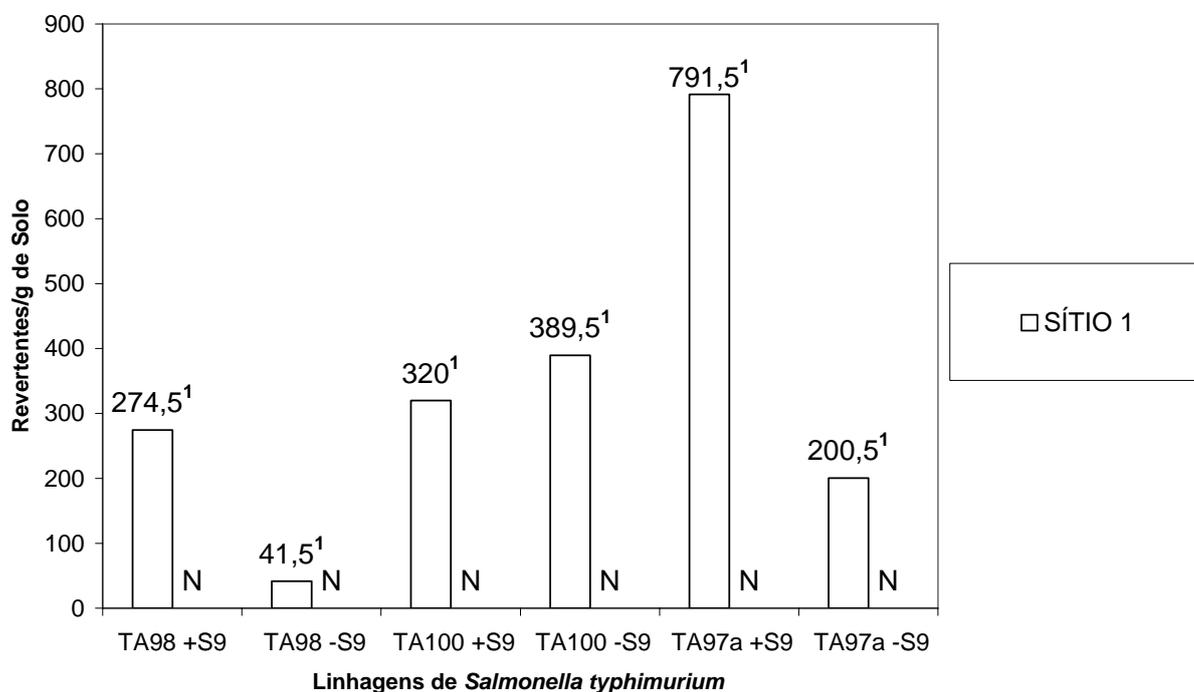
## RESULTADOS

Os resultados estão sumarizados nas Figuras 1 e 2 e nas Tabelas 1 - 4. As médias e os desvios padrões, em revertentes por placa, observados nos ensaios para os controles negativos (TA98 +S9:  $37,83 \pm 10,41$ ; TA98 -S9:  $41,83 \pm 1,19$ ; TA100 +S9:  $227,83 \pm 38$ ; TA100 - S9:  $213,33 \pm 36,47$ ; TA97a +S9:  $152,16 \pm 32,52$ ; TA97a -S9:  $162,33 \pm 32,62$ ) e positivos (TA98 +S9: 2AF,  $652,83 \pm 575,44$ ; TA98 - S9: 4NQO,  $823 \pm 557,24$ ; TA100 +S9: 2AF,  $679,66 \pm 659,90$ ; TA100 - S9: AZS,  $686,33 \pm 424,93$ ; TA97a +S9: 2AF  $239,16 \pm 157,34$ ; TA97a -S9: 4NQO,  $735,33 \pm 579,12$ ) estiveram dentro do histórico do laboratório.

Do total dos bioensaios realizados, foi possível observar apenas um resultado indicativo para mutagenicidade (TA97a +S9) (Tabela 1), embora o índice de mutagênese tenha sido baixo para essa linhagem (0,99 - 1,31) (Tabela 3), e outro para citotoxicidade (+S9), apresentando menor taxa de sobrevivência (44%) em relação ao controle negativo (Figura 2), ambos para Triunfo, RS. Nas duas outras áreas (São Jerônimo e Itapuã), houve uma prevalência de 100% de respostas negativas para mutagenicidade e citotoxicidade. Somando os resultados das três amostras tanto para citotoxicidade quanto para mutagenicidade (São Jerônimo, Triunfo e Itapuã), foi encontrada uma prevalência de 92% de respostas negativas. Além disso, os valores encontrados para a resposta mutagênica de duas áreas potencialmente de referência (São Jerônimo; Triunfo) foram comparados com os valores de seus respectivos sítios contaminados (Sítio 1; Sítio 2). De acordo com a Figura 1 – para o sítio contaminado de São Jerônimo (Sítio 1)–, observaram-se respostas positivas para mutagenicidade tanto na presença quanto na ausência de fração S9 mix para todas as linhagens testadas (SILVA-JÚNIOR, 2008); em contrapartida, para a Área de Referência de São Jerônimo, houve uma prevalência de 100% dos resultados negativos. Já comparando a Área de Referência de Triunfo com o Sítio 2 (Tabela 1), foram encontradas respostas indicativas para mutagenicidade apenas em relação à linhagem TA97a (+S9), para ambos os locais. Embora a resposta indicativa tenha sido mais expressiva para o Sítio 2 (168 revertentes por grama de solo seco) do que em relação ao local de referência de Triunfo (131 revertentes por grama de solo seco), a ordem de grandeza foi similar.

Considerando a análise química de nove metais (Tabela 4), a comparação da Área de Referência de São Jerônimo com seu respectivo sítio contaminado foi realizada. Assim, no Sítio 1, foram constatadas maiores concentrações relativas para quatro metais (Al, Fe, Pb e Cd), além de apresentarem valores detectáveis para todos os nove metais analisados. Já para a Área de Referência de São Jerônimo, dois metais não foram detectados (Fe e Pb). Ainda, o

mesmo local apresentou uma concentração elevada de manganês, comparada ao seu respectivo sítio (22,4 e 0,865 mg/Kg equivalente de solo seco). Devido à alta concentração relativa do manganês nessa área de referência, o somatório das concentrações de metais analisados mostrou-se superior em relação ao Sítio 1. Já para a comparação dos dados de Triunfo, RS, dos nove metais, cinco não foram detectados na Área de Referência (Cr, Cu, Pb, Cd e Ni). Além disso, no Sítio 2, foram observadas concentrações superiores relativas para dois metais (Mn e Cu). No entanto, para a Área de Referência, o Zinco, o Ferro e o Alumínio apresentaram valores superiores relativos, sendo que, para essa mesma área, o somatório total das concentrações dos metais mostrou-se superior em relação ao Sítio 2. Para a Área de Referência de Itapuã, foram encontrados níveis detectáveis (mg/Kg solo seco) para quatro metais (Zn, Fe, Mn e Al), relacionando as concentrações desses metais à ausência de respostas mutagênicas para todas as linhagens avaliadas. (Tabela 2).



**Figura 1: Comparação das Respostas Mutagênicas para Extrato Lixiviado (São Jerônimo e Sítio 1)**

SÃO JERÔNIMO: Área de Referência

SÍTIO 1: Média de valores de uma área contaminada por carvão.

<sup>1</sup>: respostas positivas para mutagenicidade.

N: resultado negativo para mutagenicidade.

As médias e desvios padrões de revertentes por placa dos controles negativos e positivos estiveram dentro do histórico do laboratório.

**Tabela 1: Comparação das Respostas Mutagênicas para Extrato Lixiviado (Triunfo e Sítio 2).**

<b>Linhagem de <i>S. typhimurium</i></b>	<b>Triunfo</b>	<b>Sítio 2</b>
TA98 +S9	N	N
TA98 -S9	N	N
TA100 +S9	N	N
TA100 -S9	N	N
TA97a +S9	131 <sup>2</sup>	168 <sup>2</sup>
TA97a -S9	N	N

TRIUNFO: Área de referência.

SÍTIO 2: Valores de uma área contaminada por preservantes de madeira.

<sup>2</sup>: indicativo para mutagenicidade; os valores estão apresentados em revertentes/g de solo seco.

N: resultado negativo para mutagenicidade.

As médias e desvios padrões de revertentes por placa dos controles negativos e positivos estiveram dentro do histórico do laboratório.

**Tabela 2: Comparação das Respostas Mutagênicas para Extrato Lixiviado (Itapuã).**

<b>Linhagem de <i>S. typhimurium</i></b>	<b>Itapuã</b>
TA98 +S9	N
TA98 -S9	N
TA100 +S9	N
TA100 -S9	N
TA97a +S9	N
TA97a -S9	N

ITAPUÃ: Área de referência.

N: resultado negativo para mutagenicidade.

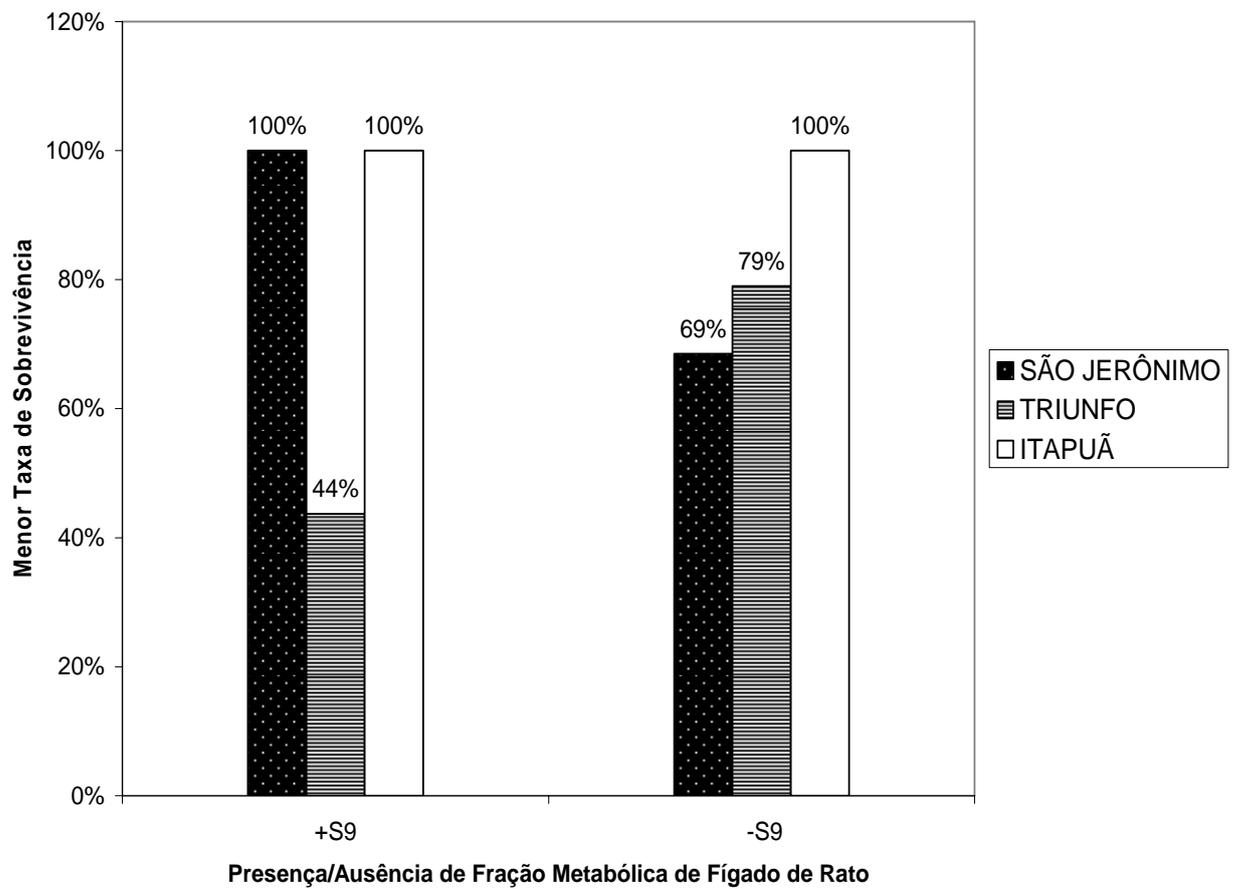
As médias e desvios padrões de revertentes por placa dos controles negativos e positivos estiveram dentro do histórico do laboratório.

**Tabela 3: Índice de Mutagênese (IM) das Áreas Avaliadas para Referência**

<b>SÃO JERÔNIMO</b>						
<b>Linhagem</b>	<b>25 mg</b>	<b>50 mg</b>	<b>75 mg</b>	<b>100 mg</b>	<b>150 mg</b>	<b>200 mg</b>
<b>TA98+S9</b>	1,08	1,06	0,91	1,18	0,79	0,70
<b>TA98-S9</b>	1,14	0,77	1,15	1,16	1,11	1,15
<b>TA100+S9</b>	0,80	0,85	0,82	0,90	0,98	1,04
<b>TA100-S9</b>	0,95	1,05	0,97	1,15	0,89	0,90
<b>TA97a+S9</b>	1,01	0,88	0,83	0,82	0,81	0,57
<b>TA97a-S9</b>	1,14	1,17	1,01	0,88	0,72	0,87
<b>TRIUNFO</b>						
<b>TA98+S9</b>	0,87	0,75	0,98	0,84	0,75	0,98
<b>TA98-S9</b>	0,92	1,09	0,87	1,11	0,82	0,98
<b>TA100+S9</b>	1,14	1,05	1,09	0,98	0,96	0,92
<b>TA100-S9</b>	1,06	1,05	1,00	1,02	1,16	0,95
<b>TA97a+S9</b>	1,15	1,15	1,07	0,99	1,21	1,31
<b>TA97a-S9</b>	1,00	1,01	1,20	1,06	1,04	1,08
<b>ITAPUÃ</b>						
<b>TA98+S9</b>	1,34	1,23	1,34	1,34	1,16	1,22
<b>TA98-S9</b>	0,63	0,73	0,75	0,87	0,75	0,59
<b>TA100+S9</b>	1,06	0,99	0,98	1,05	1,03	0,94
<b>TA100-S9</b>	1,23	1,17	1,19	1,07	1,36	1,02
<b>TA97a+S9</b>	1,18	1,25	1,23	1,25	1,28	1,29
<b>TA97a-S9</b>	1,18	1,07	1,00	1,17	1,10	0,96

**IM: razão dos revertentes de cada dosagem/revertentes do controle negativo (solvente ácido pH 4,93 ± 0,05).**

As seis dosagens avaliadas foram: 25, 50, 75, 100, 150 e 200 mg equivalentes de solo seco.



**Figura 2: Citotoxicidade para a Linhagem TA98 de *Salmonella typhimurium* em Fração Lixiviada.**

A amostra é considerada citotóxica quando o percentual de sobrevivência das células for inferior a 60% em, pelo menos, uma das dosagens, comparadas com o controle negativo.

**Tabela 4: Concentração de nove metais, submetidos à extração lixiviada (pH = 4,93 ± 0,05).**

<b>Metais</b>	<b>São Jerônimo</b>	<b>Sítio 1</b>	<b>Triunfo</b>	<b>Sítio 2</b>	<b>Itapuã</b>
Zinco	0,640	0,390	0,600	0,450	0,200
Ferro	ND	0,520	1,050	ND	0,060
Manganês	22,400	0,865	0,150	0,3	0,500
Alumínio	1,360	3,975	3,750	1,950	0,400
Cromo	0,020	0,012	ND	ND	ND
Cobre	0,138	0,084	ND	0,045	ND
Chumbo	ND	0,020	ND	ND	ND
Cádmio	0,008	0,017	ND	ND	ND
Níquel	0,058	0,030	ND	ND	ND
<b>Somatório das Concentrações</b>	24,624	5,913	5,550	2,745	1,160

<sup>1</sup>mg/Kg equivalente de solo; ND: não-detectado.

Níveis de Detecção dos metais por ICP – OES (Zn: 0,02; Fe: 0,04; Mn: 0,03; Al: 0,08; Cr: 0,004; Cu: 0,004; Pb: 0,02; Cd: 0,002; Ni: 0,004).

## DISCUSSÃO

Sabe-se, pela literatura, que alguns metais são conhecidos como mutagênicos e carcinogênicos, como o  $\text{Cd}^{+2}$ , o  $\text{Ni}^{+2}$ , o  $\text{Pb}^{+2}$  (OLIVEIRA, 2008). Além disso, o  $\text{Cr}^{4+}$  pode ser mutagênico, sobretudo, para *Salmonella typhimurium* (MARZIN & PHI, 1985), uma vez que é bastante solúvel e biodisponível à célula. Em contrapartida, o  $\text{Cr}^{3+}$  não induz efeitos genotóxicos para a maioria dos estudos (De FLORA *et al.*, 1990). Em outros trabalhos, para avaliar o potencial mutagênico do Chumbo em diversos bioensaios, foram relatados problemas de solubilidade, podendo comprometer a biodisponibilidade desse metal à biota testada (WINDER & BONIN, 1993). Já outros compostos inorgânicos são conhecidos como não-carcinógenos (Zn, Al, Cu, Mn, Fe) (MARZIN & PHI, 1985). Todavia, a linhagem TA97a pode ser sensível a metais bivalentes, como  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Cd}^{++}$  e  $\text{Zn}^{++}$ , induzindo respostas mutagênicas, embora o  $\text{Mn}^{++}$  seja um mutágeno menos expressivo para o ensaio *Salmonella*/microsoma (GERBER *et al.*, 2002).

Assim, os resultados obtidos para Triunfo sugerem que a linhagem TA97a, tanto para Área de Referência quanto para o Sítio 2 (Tabela 1), na presença da fração S9, se mostrou mais sensível a metais para ambos os ensaios (mutagenicidade/citotoxicidade). Avaliando as concentrações de metais (Tabela 4), constata-se que apenas o manganês e o cobre apresentaram resultados superiores comparado à referência de Triunfo. No entanto, as diferenças entre os locais em valores de mutagênese são baixos, não podendo diferenciar o sítio contaminado da área de referência. Além disso, sugere-se que a concentração de quatro metais (Zn, Mn, Al e Fe) para a Área de Referência de Triunfo e a de outros quatro (Zn, Mn, Al, Cu) para o Sítio 2, associadas ao somatório dessas concentrações, possam ter induzido respostas indicativas para a linhagem TA97a nas duas amostras analisadas. A continuidade do estudo, com a caracterização de compostos orgânicos e a análise mutagênica associada, pode melhor caracterizar se as áreas de solo estudadas, como referência e como sítio contaminado, apresentam uma composição de contaminantes diferentes, investigando a sensibilidade do ensaio *Salmonella*/microsoma para esse diagnóstico.

Já na comparação das respostas obtidas para a Área de Referência de São Jerônimo e seu respectivo sítio contaminado (Figura 1), sugere-se que quatro metais (Al, Fe, Pb, Cd) devam ter contribuído fortemente na indução de respostas mutagênicas para o Sítio 1, visto que todas as linhagens apresentaram respostas positivas (BRUSICK *et al.*, 1976; NESTMANN *et al.*, 1979; MANDEL & ROSER, 1984; THRANE *et al.*, 1987). Além disso, o somatório das concentrações dos nove metais (todos detectados) para o Sítio 1 pode ter

contribuído para realçar as respostas mutagênicas, uma vez que, para a Área de Referência de São Jerônimo, dois metais não foram detectados na análise (Pb e Fe). Embora se tenha detectado uma concentração relativamente elevada do Manganês (22,4 mg/Kg) para essa área de referência, segundo a literatura, *Salmonella typhimurium* é seletiva para esse metal, uma vez que, além de a espécie apresentar um sistema de efluxo de  $Mn^{2+}$  muito eficiente, diversos metais de transição, como o  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ , podem inibir o processo de entrada do  $Mn^{2+}$  na célula (KEHRES *et al.*, 2000). A partir disso, sugere-se que o Manganês, mesmo em altas concentrações, não foi responsável pela indução de respostas mutagênicas para a Área de Referência de São Jerônimo, como foi observado. Além disso, deve-se levar em consideração que alguns metais, encontrados em maiores concentrações nas amostras (Mn, Fe, Al e Zn), geralmente, fazem parte da própria composição dos solos (SILVA-JÚNIOR, 2008).

Para a Área de Referência de Itapuã, pode-se inferir que as concentrações encontradas dos quatro metais (Zn, Fe, Mn e Al) na amostra não foram preponderantes para induzir mutagênese em nenhuma linhagem testada, visto que foi observado 100% de respostas negativas para mutagenicidade.

É importante ressaltar também que, mesmo sendo detectadas altas concentrações relativas de alguns metais (Zn, Fe, Cr, Cu e Ni) nas áreas de referência, houve uma predominância de resultados negativos, indicando, assim, que esses metais não apresentam caráter mutagênico no solo nessas concentrações.

## CONCLUSÕES

É difícil encontrar locais de referência que não apresentem nenhum indício de resposta mutagênica, mesmo para locais sem um histórico de contaminação, uma vez que os constituintes do solo, por exemplo, podem ter potencial para induzir mutagênese tanto direta quanto indiretamente. Por esse motivo, é fundamental avaliar a resposta mutagênica, associada à caracterização química, a fim de detectar os níveis basais dessas respostas para mutagenicidade, com intuito de buscar áreas de referência e compará-las com sítios contaminados, em situações similares.

Como a área de TRIUNFO apresentou respostas mutagênicas indiretas para a fração lixiviada e caracterização química similares em relação ao sítio contaminado por preservantes de madeira, sugere-se que apenas os locais de SÃO JERÔNIMO e de ITAPUÃ possam ser utilizados como referência para solos sob suspeita de contaminação por metais pesados, uma vez que foi observada uma prevalência de 100% de resultados negativos nessas duas áreas.

Portanto, o estudo da concentração de metais pesados nos solos, associado a bioensaios, poderá contribuir na triagem e na definição de valores referenciais de mutagênese e de metais pesados, para solos no Sul do Brasil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT-NBR-10005) Procedimento para obtenção de extrato lixiviado de resíduos sólidos. Rio de Janeiro, Brasil, 2004.
- ALFHEIM, I.; BJORSETH, A.; MOLLER, M. Characterizations of microbial mutagens in complex samples—methodology and applications, *CRC Crit. Rev. Environ. Control* 14, p. 91–150, 1984.
- BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; McCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutation Research* 97, p. 267 – 281, 1982.
- BRADY, C. **The Nature and Properties of Soils**. 8 ed. Macmillan Publishing Co., Inc., New York, NY, p. 639, 1974.
- BRUSICK, D.; GLETTEN, F.; JAPANNATH, O.; WEEKE, V. The mutagenic activity of ferrous sulfate for *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* 38, p.380-381, 1976.
- CARDOZO, T. C., ROSA, D. P., FEIDEN, I.R., ROCHA, J. A. V., OLIVEIRA, N. C. D., PEREIRA, T. S., PASTORIZA, T. S., MARQUES, D. M., LEMOS, C. T., TERRA, N. R., VARGAS, V. M. F. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. *Mutation Research* 603, 83 -96, 2006.
- CLAXTON, L. The development, validation, and analysis of *Salmonella* mutagenicity test methods for environmental situations, in: P. WELLS, K. LEE, C. BLAISE (Eds.), **Microscale Testing in Aquatic Toxicology. Advances, Techniques, and Practice**, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 591–606, 1997.
- CLAXTON, L. **The integration of bioassay and physiochemical information for complex mixtures**, in: M. Waters, S. SANDHU, J. LEWTAS, L. CLAXTON, N. CHERNOFF, S. NESNOW (Eds.), *Shortterm Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures III*, Plenum Press, New York, NY, p. 153–162, 1983.
- CLAXTON, L.; GEORGE, S. Challenges and approaches for identifying carcinogens in contaminated media, in: G. SUNAHARA, A. RENOUX, C. THELLEN, A. PILON (Eds.), **Environmental Analysis of Contaminated Sites, John Wiley & Sons**, West Sussex, UK, p. 73–93, 2002.
- CORONAS, M. V.; HORN, R. C.; DUCATTI, A.; ROCHA, J. V.; VARGAS, V. M. F. Mutagenic activity of airborne particulate matter in a petrochemical industrial área. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 650 (2), p. 196 – 201, 2008.

- COURTY, B.; CURIEUX F. L.; BELKESSAM L.; LABOUDIGUE A.; MARZIN, D. Mutagenic potency in *Salmonella typhimurium* of organic extracts of soil samples originating from urban, suburban, agricultural, forest and natural areas. **Mutation Research** 653, p. 1–5, 2008.
- De FLORA; BAGNASCO, M.; SERRA, D.; ZANACCHI, P. Genotoxicity of chromium compounds: a review. **Mutation Research/Review in Genetic Toxicology**. v. 238, n.2, p. 99 – 172, 1990.
- DeMARINI, D. Environmental mutagens/complex mixtures, in: A. Li, R. Heflich (Eds.), **Genetic Toxicology**, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 285–302, 1991.
- DeMARINI, D. M. Induction of mutation spectra by complex mixtures: approaches, problems, and possibilities, **Environ. Health Perspect.** 102 (Suppl. 4), p.127–130, 1994.
- DeMARINI, D.M. Mutation spectra of complex mixtures. **Mutat. Res.** 411, p. 11–18, 1998.
- DONNELLY, K. C.; ANDERSON, C.S.; BARBEE, G.C.; MANEK, D.J. Soil toxicology, in: L.G. Cockerham, B.S. Shane (Eds.), **Basic Environmental Toxicology**, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 321–352, 1994.
- DONNELLY, K. C.; BROWN, K. W.; DI GIULLIO, D. G. Mutagenic characterization of soil and water samples from a Superfund site, **Nucl. Chem. Waste Manage.** 8, p.135–142, 1988.
- DONNELLY, K. C.; BROWN, K. W.; MARKIEWICZ, K. V.; ANDERSON, C. S.; MANEK, D. J.; THOMAS, J. C.; GIAM, C. S. The use of short-term bioassays to evaluate the health and environmental risk posed by an abandoned coal gasification site, **Hazard. Waste Hazard. Mater.** 10, p. 59–70, 1993.
- DONNELLY, K. C.; SAFE, S. H.; RANDEPATH, K.; RANDEPATH, E. Bioassay-based risk assessment of complex mixtures, **J. Hazard Mater.** 41, p.341–350, 1995.
- DONNELLY, K. C; BROWN, K. W.; ANDERSON, C. S.; THOMAS, J. C.; SCOTT, B. R. Bacterial mutagenicity and acute toxicity of solvent and aqueous extracts of soil samples from an abandoned chemical manufacturing site. **Environ. Toxicol. Chem.** 10, p. 1123–1132, 1991.
- DRAGUN, J. **The Soil Chemistry of Hazardous Materials**. Amherst Scientific Publishers, Amherst, MA, p. 862, 1998.
- EDENHARDER, R.; ORTSEIFEN, M.; KOCH, M.; WESP, H. F.; Soil mutagens are airborne mutagens: variation of mutagenic activities induced in *Salmonella typhimurium* TA98

- and TA100 by organic extracts of agricultural and forest soils in dependence on location and season. **Mutat. Res.** 472, p.23–36, 2000.
- EPA. Environmental Protection Agency. Method 3545A. Pressurized Fluid Extraction (PFE). <http://www.epa.gov/sw-846/pdfs/3545.pdf>, 2007.
- ESTEVE-NÚÑEZ, A., CABALLERO, A. & RAMOS, R. Biological degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. **Microbiol Mol. Biol. Rev.** 65(3): 335-352, 2001.
- FERGUSON, J. E. **The Heavy Elements: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects**. Pergamon Press, Oxford, 1990.
- GERBER, G. B.; LÉONARD, A.; HANTSON. Ph. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** 42, p. 25 – 34, 2002.
- GILMORE, E. A. Critique of soil contamination and remediation: the dimensions of the problem and the implications for sustainable development. **Bull. Sci. Technol. Soc.** 21(5): 394-400, 2001.
- HORN, R.C., ROCHA, J.A., VARGAS, V.M.F. Determination of sediment mutagenicity and cytotoxicity in an area subject to petrochemical contamination. **Mutagenesis** 19(6), 445-451, 2004.
- HUGHES, T. J.; CLAXTON, L. D.; BROOKS, L.; WARREN, S.; BRENNER, R.; KREMER, F. Genotoxicity of bioremediated soils from the Reilly Tar site, St. Louis Park, Minnesota. **Environ. Health Perspect.** 106 (Suppl. 6), p.1427–1433, 1998.
- KADO, N. Y.; LANGLEY, D.; EISENST, E. A simple modification of the *Salmonella* liquid-incubation assay: increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. **Mutation Research**, 121, p. 25 – 32, 1983.
- KEHRES, D.G.; ZAHARIK, M.L.; FINLAY, B.B.; MAGUIRE, M. E. The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. **Molecular Microbiology**, v. 36 n. 5, p. 1085 – 1100, 2000.
- KIER, L. D.; BRUSICK, D. J.; AULETTA, A. E.; VON HALLE, E. S.; BROWN, M. M.; SIMMON, V. F.; DUNKEL, V.; MCCANN, J.; MORTELMANS, K.; KIER, L. E.. The *Salmonella typhimurium*/mammalian microsomal assay. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, **Mutat. Res.** 168, p.69– 240, 1986.
- LAGERWERFF, J. V.; SPECHT, A. W. Contamination of roadside soil and vegetation with cadmium, nickel, lead and zinc. **Environ. Sci. Technol.** 4, p. 583–586, 1970.

- LEWTAS, J. Genotoxicity of complex mixtures: strategies for the identification and comparative assessment of airborne mutagens and carcinogens from combustion sources, **Fundam. Appl. Toxicol.** 10, p. 571–589, 1988.
- LEWTAS, J.; CLAXTON, L. D.; ROSENKRANZ, H. S.; SCHUETZLE, D.; SHELBY, M.; MATSUSHITA, H.; WURGLER, F. E.; ZIMMERMANN, F. K.; LOFROTH, G.; MAY, W. E.. Design and implementation of a collaborative study of the mutagenicity of complex mixtures in *Salmonella typhimurium*. **Mutat. Res.** 276, p. 3–9, 1992.
- MANDEL, R.; ROSER, H.J.P. Mutagenicity of cadmium in *Salmonella typhimurium* and its synergism with two nitrosamines. **Mutat. Res.** 138, p. 9-16, 1984.
- MARON, D. M. & AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research** 11: 173-215, 1983.
- MARZIN, D. R. & PHI, H. V. Study of the mutagenicity of metal derivatives with *Salmonella typhimurium* TA102. **Mutation Research/ Genetic Toxicology**. v. 155, n. 1- 2, p. 49 – 51, 1985.
- McDANIELS, A. E.; REYES, A. L.; WYMER, L. J.; RANKIN, C. C.; STELMA, G. N. Genotoxic activity detected in soils from a hazardous waste site by the Ames test and the SOS Chromotest, **Environ. Mol. Mutagen.** 22, p.115–122, 1993.  
**Mutation Research** 490, 141-158, 2001.
- NESTMANN, E. R., T.I. MATULA; DOUGLAS, G. R.; BORA, K. C.; KOWBEL, D. J. Detection of the mutagenic activity of lead chromate using a battery of microbial tests, **Mutat. Res.** 66 p. 357-365, 1979.
- OHE, T., WATANABE, T., WAKABAYASHIC, K. Mutagens in surface water: a review. **Mutation Research** 567, 109 – 149, 2004.
- OLIVEIRA, S. C. B.; CORDUNEANU, O.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. In situ evaluation of heavy metal-DNA interactions using an electrochemical DNA biosensor. **Bioelectrochemistry** 72, p. 53 – 58, 2008.
- PAGANO, A. D.; ZUGER, E. Conditions for detecting the mutagenicity of divalent metals in *Salmonella typhimurium*. **Environ. Mol. Mutagen.** 19, 139-146, 1992.
- PATERSON, E.; SANKA, M.; CLARK, L. Urban soils as pollutant sink – a case study from Aberdeen, Scotland. **Appl. Geochem.** 11, p. 129–131, 1996.
- PEREIRA, T. da S., ROCHA, J. A R., DUCCATTI, A., SILVEIRA, G. A., PASTORIZA, T. F., BRINGUENTI, L. VARGAS, V.M.F. Evaluation of mutagenic activity in supply water at three sites in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mutation Research** 629, 71-80, 2007.

- PICHTEL, J.; SAWYERR, H. T.; CZARNOWSKA, K. Spatial and temporal distribution of metals in soils in Warsaw, Poland', **Environ. Pollut.** 98(2), p. 169–174, 1998.
- REEVE, R. N. Introdução de Agentes Químicos no Ambiente, p. 15 -38. *In*: Zagatto, P. A., Bertoletti, E. (orgs.), **Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações**, RIMA, São Carlos, SP p. 478, 2006.
- ROSSMAN, T. G.; MOLINA, M.; MEYER, L.W.; BOONE, P.; KLEIN, C.B.; WANG, Z. LI, F.; LIN, W.C.; KINNEY, P.L. Performance of 133 compounds in the lambda prophage induction endpoint of the microscreen assay and a comparison with *S. typhimurium* mutagenicity and rodent carcinogenicity assays, **Mutat. Res.** 260, p.349–367, 1991.
- SCHNOOR, J.L. **Environmental Modeling: Fate and Transport of in Water, Air and Soil**. New York: John Wiley e Sons, Cap. 8, 1996.
- SHEN, L., WU, J. Y., LIN, G. F., SHEN, J. H., WESTENDORF, J., HUEHNERFUSS, H. The mutagenic potentials of tap water samples in shanghai, **Chemosphere** 52, 1641 – 1646, 2003.
- SILVA-JÚNIOR, F.M.R. **Atividade mutagênica em solos sob influência de rejeitos de carvão**. Dissertação de Mestrado em Ecologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.
- SILVA-JÚNIOR, F.M.R., VARGAS, V.M.F. Avaliação de áreas de influência de uma termelétrica a carvão através de ensaio de genotoxicidade. **J. Braz. Ecotoxicol** 2(2), 197 – 199, 2007.
- SUTHERLAND, R. A.; TOLOSA, C. A. Variation in total and extractable elements with distance from roads in an urban watershed, Honolulu, Hawaii. **Water Air Soil Pollut.** 127, p. 315–338, 2001.
- TAGLIARI, K.C., CECCHINI, R., ROCHA, J.A.V., VARGAS, V.M.F. Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. **Mutation Research** 561, p.101-117, 2004.
- THRANE, K.E.; AUNE, T.; SODERLUND, E.; AUNE, K.T.; HONGSLO, J.; MOLLER, M. Mutagenicity of ambient air pollutants collected near aluminum industries, **Atmos. Environ.** 21, p. 1957-1962, 1987.
- TSALEV, D. L.; ZAPRIANOV, Z.K. **Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Health Practice**. CRC Press Inc., USA, 1984.
- UMBUZEIRO, G. & VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para

- mamíferos, 81 -112, *In*: Ribeiro, L. R., Salvadori, D. M. F., Marques, E. K. (orgs.), **Mutagênese Ambiental**, 1 ed., ULBRA, Canoas, 356p., 2003.
- VARGAS, V. M. F., GUIDOBONO, R. R., HENRIQUES, J. A. P. Use of two short term test to evaluate genotoxicity of river water treated with different concentration extraction procedure. **Mutation Research** 343, 31-52, 1995.
- VARGAS, V. M. F., MIGLIAVACCA, S. B., MELO, A. C., HORN, R. C., GUIDOBONO, R. R., SÁ FERREIRA, I. C. and PESTANA, M. H. D. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants.
- VARGAS, V. M. F., MOTTA, V. E. P. & HENRIQUES, J. A. P. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. **Mutation Research** 319, 31 – 45, 1993.
- VARGAS, V.M.F. Mutagenic activity as a parameter to assess ambient air quality for protection of the environmental and human health. **Reviews in Mutation Research** 544, 313-319, 2003.
- WATANABE, T.; TAKAHASHI, K.; KONISHI, E.; HOSHINO, Y.; HASEI, T.; ASANOMA, M.; HIRAYAMA, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagenicity of surface soil from residential areas in Kyoto city, Japan, and identification of major mutagens. **Mutat. Res.** 649, p. 201-212, 2008.
- WATERS, M.; CLAXTON, L.; STACK, H.; GRAEDEL, T. **Genetic activity profiles — application in assessing potential carcinogenicity of complex environmental mixtures**, in: H. Vainio, M. Sorsa, A. McMichael (Eds.), *Complex Mixtures and Cancer Risk*, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, p. 75–88, 1990.
- WESP, H. F., TANG, X. & EDENHARDER, R. The influence of automobile exhausts on mutagenicity of soils: contamination with, fractionation, separation, and preliminary identification of mutagens in the *Salmonella*/reversion assay and effects of solvent fractions on the sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures and in the in vivo mouse bone marrow micronucleus assay. **Mutation Research** 472: 1-21, 2000.
- WHITE, P.A., CLAXTON, L.D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutation Research** 567, 227–345, 2004.
- WINDER, C. & BONIN, T. The genotoxicity of lead. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenis**. V. 285, n. 1, p. 117 – 124, 1993.

WINEGARDNER, D. **An Introduction to Soils for Environmental Professionals**, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, p. 270, 1995.

WINEGARDNER, D. **An Introduction to Soils for Environmental Professionals**, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, p.270, 1995.

WONG, P. K. Mutagenicity of heavy metals. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 40, p. 597–603, 1988.