

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Atividade mutagênica em bacia hidrográfica influenciada por sítio
de contaminação de solos**

Thatiana Cappi da Costa

Porto Alegre, abril de 2010.

Atividade mutagênica em bacia hidrográfica influenciada por sítio de contaminação de solos

Thatiana Cappi da Costa

Dissertação apresentada ao programa de Pós – Graduação em Ecologia do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Vera Maria Ferrão Vargas

Co – orientador: Prof^ª. Dr^ª. Silvia Tamie Matsumoto

Comissão examinadora:

Dra. Maria Aparecida Marin – Morales (membro externo)

Dra. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade (membro externo)

Dr. Alexandre Arenzon

Porto Alegre, abril de 2010.

À Deus pela vida,

À José Carlos, Maria José e Felipi.

“O jeito é: ou nos conformamos com a falta de algumas coisas na nossa vida ou lutamos para realizar todas as nossas loucuras...”

(Mario Quintana)

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida.

Aos meus queridos pais, José Carlos e Maria José pelo incentivo, carinho e palavras de conforto nos momentos em que mais precisei nesta jornada a consideráveis quilômetros de distância de casa. Amo vocês por me apoiarem neste sonho.

À minha outra metade, meu irmão Felipi, em suas poucas palavras consegue ser amoroso e parceiro.

À minha avó, Dona Lourdes por achar o máximo uma neta estudar tanto e me incentivar a continuar me aperfeiçoando.

Aos meus tios, tias e primos por estarem sempre presentes e compartilharem suas opiniões sobre meu trabalho, somando ao meu desenvolvimento.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela oportunidade de usufruto do curso de Pós-Graduação em Ecologia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, aos professores pelo conhecimento transferido e a amizade e à Silvana pelo carinho e por estar sempre pronta a resolver os problemas administrativos.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

À Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler (FEPAM).

À Maria Lúcia e a Karen da Divisão de Química da FEPAM pelas análises químicas.

Ao departamento de coleta da FEPAM pelo auxílio nas coletas.

Ao Jean do Instituto de Pesquisas Hidráulicas da UFRGS pelos dados geológicos.

Aos amigos e companheiros da FEPAM que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Especialmente à Mari Coronas e Déia pela disponibilidade e paciência para me ensinar o teste de Ames, a Tati SP pelas trocas de idéias e aprendizado, ao Flávio pelas trocas de artigos e pela disposição a me socorrer com alguns dados, a Kelly pela parceria nos testes, a Roberta pelas altas risadas e por compartilhar do mesmo sonho que eu: fazer o mestrado na ecologia com a Vera Vargas! Aos estagiários, especialmente a Cris por se mostrar sempre disponível. A Tita, por estar sempre presente e claro, obrigada pelos extratos!! À Monice pela companhia, e dividir dicas de moda e maquiagem!!

À minha orientadora. Desde que a conheci a partir de uma palestra em 2005, no Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese Ambiental, em Natal/RN, sonhei se um dia fosse fazer mestrado, seria com ela. É meu referencial de profissionalismo desde a graduação. As expectativas que sempre nutri foram completamente supridas. Agradeço por ter me aceitado como orientanda, pela confiança depositada e por compartilhar de seus conhecimentos.

À Silvia Tamie por ter aceitado o convite de continuar me orientando, desta vez como co-orientadora. Obrigada por disponibilizar o laboratório na UFES para o desenvolvimento de parte deste trabalho. Acima de tudo agradeço a amizade e apoio.

À família Zembrzuski pelo carinho e apoio, ao seu Silvio e dona Cleusa por ser como meus pais aqui no sul, e a Vê uma amiga queridíssima, talvez mais que amiga neste período em que estive neste Estado encantador. Uma frase de almanaque: “Irmão é um amigo que a natureza nos impõe e amigos são irmãos que o coração escolhe”.

Aos amigos de longa data que acompanham meu desenvolvimento a muito tempo, obrigada pelo carinho e reuniões para matar as saudades em ótimos períodos de idas e vindas a Vitória. À Aline Gazolli, Ju Laender, Lícia Pacheco, Lô Capucho, Mai Cogo, Mari Aragão, Pri Stein, Sah Mariani, Tati Borja e ao parceiro da mulherada, Caio Marcos.

Aos amigos da graduação que se fizeram tão presentes, mesmo que virtualmente. A Jú Miranda, Bella Carleto, Janine Pedroza, Digão e a sempre companheira de laboratório, Maressa.

Às amigas gaúchas Renatinha e Vê Contini, com quem aprendi a gostar desta cultura tão rica. Obrigada pelos papos regados a um bom chimarrão e aos bons momentos na cidade baixa e na redenção.

Ao Cristiano Antunes pelo carinho e atenção nesta reta final do mestrado.

Aos amigos da Pós, em especial ao André Felipe, Zé, Vê e Titi pela parceria, pelo carinho, pelo papo e por fazer o período do mestrado mais doce e divertido.

À Dra. Maria Aparecida Marin – Morales, Dra. Heloisa Helena Rodrigues de Andrade e Dr. Alexandre Arenzon por terem aceitado fazer parte da banca desta dissertação.

E a todas as pessoas envolvidas diretamente ou indiretamente neste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

A região objeto do presente estudo compreende uma área localizada às margens do rio Taquari, no município de Triunfo (RS), que pertence à bacia hidrográfica Taquari – Antas, com contaminação de solo específica por preservantes de madeira, cujo passivo ambiental são pentaclorofenol, creosoto e hidrosal arseniato de cobre cromado. O local é percorrido por corpos d'água associados à drenagem principal, formando sub-bacias. Através dos ensaios de microssuspensão com *Salmonella/microsoma* e *Allium cepa*, o trabalho teve por objetivo relacionar a atividade genotóxica com rotas de dispersão de poluentes. Analisando a área do sítio contaminado a partir dos extratos orgânicos do material drenado para o corpo d'água, após eventos de chuvas significantes e análises de extrato orgânico, água intersticial e sedimento bruto do rio. No teste *Salmonella/microsoma*, diversas linhagens permitiram avaliar diferentes danos ao DNA, como deslocamento no quadro de leitura (TA97a e TA98) e substituição de pares de base (TA100) em ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica. No teste de *Allium*, foi possível verificar alterações em nível cromossômico. Respostas positivas de mutagenicidade pelo teste de *Salmonella/microsoma* do material exportado para fora da área do sítio indicam que este material pode estar sendo carregado para o rio Taquari. Isto pode ser evidenciado pela atividade mutagênica detectada em ambos os testes, na amostra de sedimento do rio coletada em frente ao sítio contaminado. O ponto a jusante no rio em relação ao ponto em frente ao sítio contaminado também foi avaliado e atividade mutagênica foi detectada, já o ponto de referência a montante mostrou pequena atividade mutagênica proveniente de fonte de contaminação diferente. Entretanto, tais poluentes não foram detectados no ponto abaixo. Os bioensaios empregados puderam indicar um possível risco de contaminação para o rio Taquari e mostraram ser eficientes para avaliar a mutagenicidade no material drenado do solo e no sedimento do rio. Embora a atividade mutagênica possa ser relacionada em parte à presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nos extratos orgânicos das amostras, derivados do preservante de madeira creosoto ou de fontes antrópicas diversas, outros compostos orgânicos podem ser encontrados nos extratos, uma vez que resíduos de pentaclorofenol estão presentes no sítio. Além disso, a complexidade das amostras de sedimento do rio poderia ainda sofrer a influência de traços de metais pesados

Palavras – chave: Mutagenicidade; *Salmonella*/microsoma; *Allium cepa*; preservativos de madeira; sítio de solo contaminado.

ABSTRACT

Mutagenic activity, using *Salmonella*/microsome and *Allium cepa* bioassay, was employed as markers to detect pollutant dispersion routes in contaminated soil site covered by water bodies associated with the drainage toward the river. The site of the present study comprises an area located along the banks of the Taquari River, in the city Triunfo (RS) belonging to the Taquari - Antas river basin with identified environmental contaminants (pentachlorophenol, creosote and hydrosalt CCA). The *Salmonella*/microsoma test evaluated organic extracts of the material drained into the water body after significant rain events as well as Taquari River samples including organic sediment extract, interstitial water and gross sediment. In the *Salmonella*/microsome test, different strains enabled evaluation of different DNA mutations including frameshift (TA97a and TA98) and base pair substitution (TA100) in the absence (-S9) and presence (+S9) of metabolic activation. The *Allium* test allowed verification of chromosomal alterations. Positive mutagenicity results in the *Salmonella*/microsome assay of material from the area indicate that contaminant mixtures may have drained into the Taquari River, as indicated by mutagenic activity detected in both bioassays in sediment samples collected at the contaminated site. Mutagenic activity was also detected at a site downstream from the contaminated site. Although the reference area upstream showed low mutagenic activity originating from a different pollutant source, such pollutants were not found at the downstream sites. The bioassays employed, mainly the *Salmonella*/microsome assay, can indicate a possible contamination route toward the Taquari River and were proven efficient at evaluating the mutagenicity of drained soil material and sediment from the river.

Keywords: *Salmonella*/microsome assay; *Allium cepa* test; wood preservation; contaminated soil site.

LISTA DE FIGURAS

Figura A: Localização da Bacia Hidrográfica Taquari – Antas e do sítio de solo contaminado as margens do Rio Taquari.....	37
Figura B: Área da Usina as margens do rio Taquari.....	38
Figure 1: The Taquari – Antas river basin and sampling areas.....	50
Figure 2: Internal area of the wood plant and samples localization.....	51
Figure 3: Sampler 1 and Sampler 2.....	52
Figure 4: Meteorological and granulometric data.....	53
Figure 5: Mutagenic potency of water (revertants/L of superficial soil drainage and sediment (revertants/g of dry sediment equivalent) from superficial soil drainage to total sum of the strains that detect frameshift and base-pair substitution mutagens in the absence and presence of metabolic activation in site and sampling carried out	63
Figure 6: Mutagenic potency in revertants per gram of dry sediment equivalent to total sum of the strains that detect frameshift and base-pair substitution mutagens in the absence and presence of metabolic activation in site and sampling carried out	71
Figure 7: Results of mitotic index (MI), chromosome aberration index (CA), mutagenic index (Mut I) and germination index (GI).....	72

LISTA DE TABELAS

Table 1: Mutagenic responses of organic extract liquid - liquid (revertants/L water equivalent) and organic extract of sediment (revertants/g dry sediment equivalent) and cytotoxicity (L or g dry sediment equivalent) in presence and absence of S9 mix, from superficial soil drainage in Winter (W) and Spring (S) of 2008	62
Table 2: Organic chemical analyses for PHAs in mg/Kg of sediment drained for out off the contaminated soil site in August/2008 and October/2008 sampling (A) and a characterization of Taquari sediment (B).	64
Table 3: Mutagenic response of sediment organic extract (revertants/g dry sediment equivalent) and interstitial water (revertants/mL) and cytotoxicity (ml or g dry sediment equivalent) in presence and absence of S9 mix, from Taquari river basin in two sampling in Summer (S) and winter (W).r.....	70

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1 Ambiente aquático.....	15
1.2 Solos contaminados.....	17
1.3 Preservantes de Madeira.....	20
1.4 Bioensaios de genotoxicidade.....	25
1.5 Ensaio de <i>Salmonella</i> /microsossoma.....	28
1.6 Ensaio de <i>Allium cepa</i>	31
1.7 Área de Estudo.....	34
2. OBJETIVOS.....	39
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	40
3.1 Introduction.....	44
3.2 Material and methods.....	46
3.2.1 Sampling site.....	46
3.2.2 Sediment proceeding from contaminated site.....	47
3.2.3 Taquari River Sediment.....	48
3.2.4 Sample preparation.....	54
3.2.4.1 Organic extract liquid – liquid.....	54
3.2.4.2 Sediment organic extract.....	54
3.2.4.3 Interstitial Water and Gross sediment.....	55
3.2.5 Mutagenicity Assays.....	55
3.2.5.1 Salmonella microsuspension bioassay.....	55
3.2.5.2 Allium cepa assay.....	57
3.2.6 Chemical Analyzes.....	58
3.3 Results and Discussion.....	59

3.3.1 Assessment of superficial soil drained proceeding from contaminated soil site.....	59
3.3.2 Taquari river sediment.....	65
3.4 Acknowledgement.....	73
3.5 References.....	73
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
5 REFERÊNCIAS.....	81
ANEXOS	

LISTA DE ABREVIACÕES

ABPM – Associação Brasileira dos Preservadores de Madeira

CCA – Arseniato de cobre cromado

CCB – Borato de cobre cromado

HPA/PHA – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

IARC – Agência de Pesquisa sobre o Câncer

PCP - Pentaclorofenol

UNEP – Programa Ambiental das Nações Unidas

US EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

WHO – Organização Mundial da Saúde

1 Revisão de Literatura

1.1 Ambiente Aquático

A qualidade da vida humana está diretamente e indiretamente ligada à saúde do ambiente, onde interações complexas entre os componentes abióticos (ar, água, solo) e bióticos (bactéria, vegetais, animais, entre outros) sustentam a vida. A deterioração da qualidade de algum destes componentes pode ocasionar prejuízos ao ecossistema (Jha, 2004). Como consequência do crescimento populacional e do desenvolvimento industrial, a produção, o consumo e a disposição de químicos e resíduos aumentam no ambiente, principalmente no compartimento aquático, que é o último receptor destes contaminantes (Jha, 2004). Tal compartimento tem papel vital para o funcionamento do ecossistema. Água superficial, tal como a de rios, lagos e mares, é utilizada como fonte de abastecimento, irrigação e recreação. Sua contaminação por efluentes de origens industrial, agrícola e doméstica, incluindo as estações de tratamento de esgoto, apresenta consequências sobre a saúde pública e ao ecossistema aquático (Ohe et al., 2004).

Cazenave et al. (2009) ressalta que atividades antrópicas são fatores chave no aumento dos níveis de contaminantes em ambientes aquáticos, cuja água é caracterizada como uma mistura ambiental complexa. Nesta, é possível detectar uma diversidade de compostos químicos persistentes que apresentam propriedades mutagênicas e/ou clastogênicas (Frenzilli et al., 2009).

Organismos aquáticos, quando expostos a estes contaminantes genotóxicos, podem bioacumular tais compostos e transferi-los, através da teia alimentar, a outros seres vivos. Outro risco ecológico apontado pelos pesquisadores são as ações destes poluentes sobre o

material genético que resultam em mutações hereditárias com efeitos deletérios ao organismo. Estas podem ocasionar perda da diversidade genética que influencia, a longo prazo, a sobrevivência das populações (Jha, 2004). Pollack et al. (2003) reforçam que químicos persistentes no ambiente não oferecem apenas risco ecológico, mas também ameaçam a saúde, induzindo câncer em humanos.

Segundo o sistema de classificação da Agência de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), Ohe et al. (2004) relatam que a maior parte dos agentes químicos liberados na água superficial e na atmosfera, apresentam atividades mutagênica e/ ou clastogênica classificadas em dois tipos: persistentes (incluindo metais e orgânicos policíclicos aromáticos) e voláteis. Esses compostos de ação mutagênica são identificados como prioritários para controle ambiental.

Além de contaminar a coluna d'água, os poluentes podem comprometer o sedimento. Este são depósitos de restos físicos e biológicos que atuam como dissipadores para uma grande variedade dos poluentes orgânicos e inorgânicos (Perelo, 2010).

Sedimentos marinhos e dulcícolas são matrizes dinâmicas e complexas, compostas de matéria orgânica em vários estágios de decomposição, mineral particulado que varia em tamanho e composição química e material inorgânico. Muitos poluentes aquáticos estão predominantemente associados com depósitos finos, ricos em matéria orgânica. O destino ambiental, a biodisponibilidade e a toxicidade destes poluentes, particularmente os orgânicos semi-voláteis, são determinados pela interação com estes depósitos (Chen & White, 2004). Além disso, este depósito de mutágenos persistentes no sedimento pode ser continuamente reintroduzido na coluna d'água via ressuspensão e transferência trófica (Perelo, 2010).

A utilização integrada de análises químicas, bioquímicas e celulares é considerada um dos procedimentos de escolha para detectar impactos de contaminantes sobre sistemas aquáticos (Ohe et al., 2004). A relevância de detectar riscos mutagênicos/ genotóxicos associados com a poluição da água foi compreendida no final dos anos 70, quando se desenvolveram métodos baseados no bioensaio com *Salmonella*, mexilhões e peixes (Frenzilli et al. 2009). Barata et al. (2005) declara que a avaliação ecológica da qualidade da água é fundamental para a gestão das águas superficiais e a proteção dos ecossistemas aquáticos. Seu status ecológico é definido por critérios biológicos, químicos, morfológicos e hidrológicos (Eisele, 2003).

Desde 1980, regulamentações que limitam os parâmetros de qualidade da água têm sido promulgadas. A iniciativa privada e o governo têm gasto bilhões de dólares na gestão das substâncias tóxicas liberadas no ambiente, em muitos países do mundo. No Brasil, a resolução nº357 (CONAMA, 2005), dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. No Rio Grande do Sul, a Resolução CONSEMA n °129 complementa os parâmetros de avaliação química de efluentes e dispõe sobre critérios e padrões de emissão para toxicidade de efluentes líquidos lançados em águas superficiais no Estado (CONSEMA, 2006). Outra resolução de grande importância é a n° 396 (CONAMA, 2008) que enquadra as águas subterrâneas.

1.2 Solos contaminados

Segundo White e Claxton (2004), o solo é um meio dinâmico e complexo que forma a interface da atmosfera, litosfera, hidrosfera e biosfera. Caracteriza-se por um agregado de

mineral não consolidado e material orgânico produzido por uma complexa combinação de processos físicos, químicos e biológicos. Suas propriedades variam no tempo e no espaço, dependendo da combinação de efeitos como clima, atividade biológica, topografia e composição mineralógica da rocha de origem.

Os problemas de contaminação deste compartimento são priorizados, uma vez que solos impactados podem afetar as comunidades terrestres e aquáticas através da drenagem e do escoamento de substâncias tóxicas dos locais contaminados (Fernandez et al., 1993; Cardozo et al., 2006; Da Silva Júnior & Vargas, 2009).

O solo, do ponto de vista de retenção de poluentes, difere de outros compartimentos ambientais por não apresentar deslocamento contínuo, como no caso da circulação atmosférica e da água de superfície, podendo acarretar o aumento do tempo de permanência dos contaminantes em nível local. Além disso, o solo age como um filtro, necessitando, assim, de cuidados especiais em seu uso. Entre os principais resíduos contaminantes do solo estão os metais pesados e os compostos orgânicos (Da Silva Júnior & Vargas, 2009).

Diferenças no tipo de solo podem ter grande relevância sobre a toxicidade do poluente depositado. Finas partículas de sedimento possuem carga negativa e são capazes de reter íons de carga positiva de metais tóxicos, tais como, zinco, cobre, arsênio, alumínio, cromo, níquel e cádmio. O estado oxidativo de um determinado solo pode modificar drasticamente a toxicidade de metais como alumínio e arsênio. Compostos orgânicos com baixa solubilidade em água (ex. hidrocarbonetos aromáticos, pesticidas clorados) são geralmente absorvidos pela

matéria orgânica do solo e pelas partículas de argila, o que pode resultar em alterações de sua toxicidade através da redução da biodisponibilidade e da exposição (White e Claxton, 2004).

Atividades antrópicas podem elevar a composição natural de metais e metalóides no solo, presentes naturalmente pela dissolução de rochas e minerais. Em meio aquoso, os íons metálicos podem se ligar às partículas orgânicas ou inorgânicas como, por exemplo, radical hidroxila, argila, detritos orgânicos e microrganismos. Este fenômeno é conhecido como complexação ou adsorção (Vásquez et al., 2008; Da Silva Júnior & Vargas, 2009).

Nos últimos anos, a poluição do solo por metais pesados aumentou devido às emissões atmosféricas contínuas de compostos provenientes principalmente de fontes industriais. A poluição por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) é igualmente muito elevada, também ocasionada por atividades industriais e veiculares.

Compostos genotóxicos no solo podem ter efeito sobre a saúde humana através da inalação de poeira, ingestão de plantas que absorvem os compostos do solo, bem como pela drenagem destes até águas subterrânea e superficial, que são utilizadas para abastecimento, recreação, pesca, agricultura, entre outras atividades. Entretanto, é importante conhecer o comportamento dos mutágenos no solo, uma vez que a ação destes é variável, podendo ser imóveis, como também mover-se e ingressar em outro compartimento ambiental e bioacumular (Monarca et al., 2000; Lah et al., 2008; Da Silva Júnior et al., 2009).

A deposição indiscriminada e o acúmulo dessas substâncias podem formar sítios de solos contaminados que necessitam de diagnóstico, monitoramento e processos de recuperação. A preocupação com estes sítios é em escala global como constatado pelos pesquisadores Gisbert et al. (2006), que determinaram, através de espécies vegetais, a tolerância e o acúmulo de

metais pesados em sítio de passivo ambiental proveniente de intensa atividade de mineração (exploração de chumbo e zinco) e em área agrícola próxima da região mineradora, na cidade de Valência, na Espanha. No Brasil, exemplo de sítio contaminado é relatado por Da Silva Júnior & Vargas (2009), que avaliaram solos com passivo ambiental proveniente de usina termelétrica a carvão, na região sul do Brasil, cujos rejeitos são conhecidos por danos ao meio ambiente e à saúde humana.

Visando à necessidade de prevenção da contaminação de solos, leis têm sido criadas pelos órgãos públicos com a finalidade de estabelecer uma gestão eficaz sobre este compartimento. No Brasil, por exemplo, a resolução n° 420 (CONAMA, 2009), dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. No entanto, esta legislação não contempla, a exemplo de outras no país como a CONAMA n° 357 e a CONSEMA n° 129, ensaios biológicos que permitem definir, pelo efeito, a presença destes compostos, que, mesmo em baixas dosagens, formam misturas complexas de alta reatividade (Vargas et al., 2008).

1.3 Preservantes de Madeiras

A madeira apresenta uma gama de usos nos meios rural e urbano. Muitas de suas características a tornam atrativa como material de construção, como as excelentes propriedades resistência – densidade, baixo custo e fácil produção (Hingston et al., 2001).

Após o corte da árvore, a madeira sofre decomposição ou deterioração por agentes físicos químicos e biológicos, em virtude de suas estrutura e constituição química. Vários organismos

deterioradores, como os fungos e os térmitas podem atacá-la (Yildiz et al. 2004; Paes et al., 2009).

Para prevenir alterações na qualidade mecânica da madeira e, conseqüentemente, perda econômica por parte de quem a explora, sua vida útil é elevada frente a tratamentos com inseticidas e fungicidas em diferentes estágios de produção: durante o tempo no viveiro, na estocagem e no estágio de serraria (Adam et al., 2009).

A importância da preservação da madeira no Brasil está relacionada com a diminuição da pressão sobre as florestas nativas, pois o aumento da vida útil da madeira possibilita maior conservação dos recursos naturais florestais. O setor de preservação de madeiras também tem estimulado o reflorestamento no Brasil, pois encontrou nas espécies de reflorestamento, *pinus* e eucalipto, uma alternativa para a substituição do uso das madeiras nativas, uma vez que essas espécies são passíveis de tratamento. A Lei 4.797 do Ministério de Meio Ambiente torna obrigatório em todo o território nacional, para serviços de utilidade pública destinados aos transportes ferroviário e rodoviário, serviços telegráficos, telefônicos e de fornecimento de eletricidade, o emprego de madeiras preservadas (IBAMA, 2010). Madeiras tratadas são comumente utilizadas para construções, pontes e outras aplicações (Temiz et al., 2006).

A preservação pode ser realizada por métodos naturais, indiretos, químicos e biológicos. O método mais amplamente utilizado para prevenir o ataque de organismos xilófagos é o da introdução na madeira de substâncias químicas tóxicas a esses organismos que impedem o seu desenvolvimento. Essas substâncias, ou biocidas, são agrupados em duas grandes classes: as oleossolúveis e as hidrossolúveis. A aplicação destes preservativos só é economicamente

viável se a vida útil da madeira for significativamente aumentada em relação àquela usada sem tratamento. As características ideais de um preservativo de madeira englobam mínima toxicidade aos demais seres vivos, garantia de proteção contra xilófagos, retenção do produto na madeira ao longo do tempo e custo reduzido. Entretanto, as substâncias com maior eficácia apresentam toxicidade e os produtos relativamente atóxicos são ineficientes como preservantes (Appel et al., 2007).

Segundo a Associação Brasileira dos Preservadores de Madeira (ABPM), a preservação pode ser feita por processos não industriais como imersão simples, pincelamento, aspersão, pulverização, e por meio de processos industriais realizados por vácuo – pressão em autoclaves em usinas de preservação de madeira (Appel et al., 2007).

Atualmente, dos métodos de preservação utilizados, os mais eficientes são aqueles aplicados sob condições de vácuo e pressão, e dentre estes, se destaca o processo de célula cheia ou Processo Bethell (John Bethell/ Inglaterra, 1838). Este desenvolve-se por um período inicial de vácuo, seguido pela aplicação da pressão para forçar o líquido biocida a atingir a estrutura da madeira. Entretanto, a técnica apresenta alguns inconvenientes, como baixa resistência de retenção interna do fluido após saturação da madeira, o que ocasiona sua lixiviação para o meio externo, havendo a necessidade de um adequado período para secagem. Preocupações ambientais existem devido à dificuldade de assegurar a não exposição de trabalhadores e ambiente aos líquidos e resíduos do tratamento (Kjellow & Henriksen, 2009).

Entre os preservativos oleosos, encontram-se o pentaclorofenol (PCP), o creosoto e os hidrocarbonetos clorados e, como exemplos dos hidrossolúveis, o arseniato de cobre cromado (CCA) e borato de cobre cromado (CCB).

O PCP foi um pesticida amplamente utilizado no mundo, em aplicações industriais e domésticas, com extensa utilização no tratamento da madeira, sendo registrado como inseticida, fungicida, acaricida, herbicida e desinfetante. Esse preservativo, também conhecido como Pó da China, é um dos produtos controlados no Tratado PIC GLOBAL - informação e consentimento prévio em caso de comércio ou transporte internacional- (Appel et al., 2007). No Brasil, deixou de ser produzido na década de 70 e foi proibido em 1985, através da portaria de nº 329 do Ministério da Agricultura (Ministério da Agricultura, 1985). Pode ser obtido pela cloração do fenol, através da completa substituição dos átomos de hidrogênio pelos de cloro. Conhecido por sua persistência no ambiente e comprovada carcinogenicidade, é um dos agentes que mais contamina água, solo e ar, além de difundir-se pela cadeia alimentar. Foi designado como poluente prioritário pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) e classificado como carcinógeno ambiental do grupo 2B pela IARC, o que caracteriza que é possível carcinogênico para humanos (Zhu et al., 2001). Contém em sua composição, e como produto de degradação, dioxinas e furanos. Este fato, aliado à agressividade do produto ao ser humano e à legislação que impõe crescentes restrições ao uso de biocidas organo-clorados, tem desestimulado o uso deste preservativo, embora seja um dos mais eficientes na proteção da madeira.

Outro biocida também amplamente utilizado na proteção da madeira foi o creosoto, usualmente empregado em combinação com o pentaclorofenol. Entretanto, teve seu uso

proibido, no Brasil, em 1998, pelo Decreto – lei nº 264 (Ministério da Economia, 1998). É obtido pela destilação do alcatrão de hulha, subproduto recuperado no processo de obtenção do coque siderúrgico. A composição é bem complexa, contendo mais de uma centena de compostos orgânicos: 80% de HPAs, 10% de fenóis e 3 – 13% de compostos heterocíclicos aromáticos. É considerado o mais antigo preservativo de madeiras, apresentando excelentes propriedades de toxidez a fungos, cupins e a maioria dos perfuradores marinhos. Apresenta-se insolúvel em água e não se fixa na madeira por reações químicas, apenas adere às paredes celulares ou se deposita no lume das células. Os constituintes do creosoto e seus metabólitos são conhecidos por serem tóxicos e alguns mutagênicos. Os HPAs por apresentarem baixa solubilidade em água têm sua biodisponibilidade limitada em comparação com os compostos heterocíclicos aromáticos, que são mais solúveis em água e mais móveis no solo, apresentando potencial risco para água subterrânea, água superficial e biota (Engwall et al., 1998; Ahtiainen et al., 2002; Hartnik et al., 2007). Além disso, há o problema de exsudação, que é o excesso de produto na superfície da madeira tratada. Tal característica tem causado irritação na pele das pessoas que manuseiam as peças tratadas (Appel et al., 2007).

Os modernos preservativos hidrossolúveis são constituídos pela associação de vários sais. A solução aquosa destes, ao penetrar na madeira, sofre reações de fixação e produz compostos insolúveis que dificilmente serão lixiviados. Atualmente, o preservativo mais utilizado para preservação de madeiras pertence ao grupo dos inorgânicos, como o CCA. Existem três tipos de CCA (A, B e C), sendo o tipo C o mais comum, com a composição de 47,5% de CrO_3 , 18,5% de CuO e 34% de As_2O_5 . Esse grupo tem substituído os preservativos orgânicos, que têm efeitos nocivos sobre o ambiente e a saúde humana. Os elementos metálicos do CCA estão geralmente no estado de óxidos, CrO_3 , CuO e As_2O_5 , em que o arsênio e o cobre agem

como biocidas, enquanto o cromo como fixador dos metais na madeira. Cobre (Cu), cromo (Cr) e arsênio (As) apresentam riscos potenciais para a saúde humana e para o ambiente, quando expostos a concentrações elevadas. Todos esses compostos são listados como prioritários pela US EPA. A IARC classifica o diarsênico pentóxido (As_2O_5) como cancerígeno (Hingston et al., 2001; Townsend et al., 2004).

As rotas de exposição frente a estes compostos incluem (1) contato direto humano com o químico (absorção dermal, ingestão de alimentos e água expostos aos poluentes, bem como inalação de partículas da madeira), (2) exposição do homem ao meio impactado pelos preservativos que lixiviam da madeira tratada e (3) exposição de organismos aos compostos preservativos no meio ambiente.

É conveniente destacar que todos os produtos utilizados na preservação da madeira devem ser tóxicos aos organismos biológicos que degradam a madeira, por consequência, podem ser tóxicos a homem e animais. Usá-los, sem os cuidados devidos, é arriscar a própria vida e contaminar o ambiente. A área do conhecimento que estuda a preservação da madeira é das mais dinâmicas e tem procurado insistentemente novos produtos que sejam menos agressivos ao meio ambiente (Appel et al., 2007).

1.4 Biomarcadores de Genotoxicidade

Avaliação de risco ecológico ou ambiental é definida como o procedimento pelo qual os efeitos adversos dos poluentes e outras atividades antropogênicas em ecossistemas e seus componentes são estimados a partir de metodologia científica. Dentro do grupo de descritores de origem biológica, os biomarcadores têm se destacado em diagnóstico e monitoramento

ambiental. Estes são definidos como uma medida eficaz que pode refletir a interação entre um sistema biológico e um agente ambiental (químico, físico ou biológico), evidenciada por alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais (OOST et al., 2003).

A utilização de biomarcadores pode fornecer informações sobre os efeitos biológicos de poluentes sem necessitar quantificá-los nos ecossistemas. Existem alguns critérios para identificar biomarcadores eficientes entre eles: (i) preferir respostas em nível celular, pois se sabe que estas são descritores biológicos mais universais; (ii) possuir alta sensibilidade a mínimas alterações ambientais e respostas biológicas precoces para prever danos ao meio ambiente e à saúde humana; (iii) os ensaios devem ser rápidos, baratos e de fácil realização; (iv) os controles devem ser bem definidos para se distinguir facilmente entre variações dentro dos ensaios e alterações ambientais causadas por agentes estressores; (v) as respostas devem estar relacionadas à dosagem e ao tempo de exposição e por fim; (vi) sempre que possível, deve-se dar preferência para técnicas não invasivas e não destrutivas para possibilitar estudos com espécies e populações que estejam em perigo de extinção ou que tenham naturalmente baixo tamanho populacional (Da Silva Júnior & Vargas, 2009).

Os biomarcadores são classificados em três tipos: *biomarcadores de exposição* - detectam ou medem substâncias, seus metabólitos ou, ainda, os produtos da interação entre o agente xenobiótico e alguma molécula ou célula-alvo que é medida em um compartimento dentro do organismo; *biomarcadores de efeito* - inclui medidas bioquímicas, fisiológicas ou outras alterações dentro de tecidos ou fluidos corpóreos de um organismo que podem ser reconhecidos ou associados com possíveis ou estabelecidos danos à saúde e; *biomarcadores*

de suscetibilidade - indicam uma habilidade inerente ou adquirida de um organismo para responder frente à exposição de um xenobiótico específico, incluindo fatores genéticos e mudanças nos receptores que alterem a suscetibilidade de um organismo (OOST et al., 2003).

A avaliação precoce de sinais em organismos indicadores pode prevenir os efeitos a longo prazo, em níveis populacional e de comunidade. Particularmente, os biomarcadores de genotoxicidade têm sido aplicados para prognosticar o impacto de poluentes em diversos organismos, como dano no DNA, gene e mutações cromossômicas. As bases mutagênicas de alguns cânceres e a forte associação entre mutação induzida e carcinoma confirmam a importância dos testes genotóxicos em identificar químicos carcinogênicos (Bolognesi et al., 1996).

Biomarcadores complementam e aumentam a confiabilidade de dados de análises químicas, oferecendo informações biológicas relevantes sobre o potencial do impacto de poluentes tóxicos sobre a saúde dos organismos. Atualmente, a utilização de biomarcadores para o monitoramento da qualidade ambiental, tem conquistado interesse na avaliação de águas superficiais, como rios, sedimento e solo em muitos lugares do mundo, incluindo o Brasil. (Vargas et al., 2008; Cazenave et al., 2009; White & Claxton, 2004; Ohe et al., 2004; Chen & White, 2004; Tagliari et al., 2004; Umbuzeiro et al., 2006; Da Silva Júnior & Vargas et al., 2009).

Ensaio empregados para avaliar a genotoxicidade de amostras destes compartimentos ambientais podem ser agrupados dentro de três categorias: bioensaios padronizados utilizando bactérias, tal como teste de mutagenicidade em *Salmonella* e SOS cromoteste; ensaios *in vitro* empregados em culturas de células eucarióticas, como células em peixe e mamíferos (CHO,

V79, HepG2, MCL-5, etc); sistemas *in vivo*, como ensaios com planta (*Vicia faba*, *Tradescantia*, *Allium cepa*) (White & Claxton, 2004; Ohe et al., 2004; Chen & White, 2004).

Bioensaios de curta-duração têm permitido a quantificação de mutagênicos perigosos, como o teste de mutagenicidade de *Salmonella*, amplamente utilizado para detectar atividades mutagênicas em misturas ambientais complexas tais como, água superficial e sedimento, especialmente em rios (Vargas et al., 2001; Ohe et al., 2004).

Nos ambientes naturais, os contaminantes geralmente estão presentes como misturas complexas e não existe apenas um marcador que possa fornecer um diagnóstico completo da degradação ambiental. Para superar esta dificuldade, a utilização de um conjunto de biomarcadores pode ser útil para avaliar as várias respostas das misturas de poluentes no organismo (Cazenave et al., 2009; Vargas et al., 2008).

1.5 Ensaio de *Salmonella*/microsoma

Estudos realizados para identificar e mapear os genes responsáveis pela biosíntese da histidina produziram um grande número de *Salmonella* mutantes. Em algumas destas, foram substituídos pares de base e, em outras, ocorreram adições ou deleções de uma ou mais bases em seu DNA que as impossibilitaram de sintetizar histidina (linhagens dependentes de histidina-His⁻), tornando-as incapazes de crescer em meio de cultura sem o aminoácido. Mais tarde, percebeu-se que estas linhagens mutantes poderiam ser utilizadas para identificar e caracterizar químicos mutagênicos pela sua habilidade de reverter ao estado selvagem (independentes de histidina- His⁺) e restaurar sua capacidade de síntese. As linhagens indicadoras apresentam diferentes mutações para detectar substâncias mutagênicas que alterem o DNA por deslocamento do quadro de leitura (linhagens padrões como TA98 e

TA97a) e substituição de pares de base (linhagem TA100 por exemplo) (Mortelmans & Zeiger, 2000).

Existem muitos ensaios para detectar em mutagenicidade/ genotoxicidade de água superficial, solo e sedimento, mas a utilização de bioensaios com bactérias tem provado ser muito efetiva para o monitoramento, devido à sensibilidade, baixo custo, confiabilidade e rápida resposta. O teste de mutagenicidade em *Salmonella*, também conhecido como *Salmonella*/microsoma ou Teste de Ames, é a metodologia de triagem mais utilizada para detectar substâncias genotóxicas, sendo validada, em larga escala, por diversos laboratórios (Chen & White, 2004; Ohe et al., 2004).

Os protocolos mais utilizados estão descritos em Maron & Ames (1973), que apresentam o método de pré – incubação, no qual, concentrações da amostra ambiental ou do químico a ser testado são acrescidas de alíquota de cultura da bactéria com e sem sistema de metabolização, incubadas por 20 minutos, a 37°C e semeadas em meio apropriado. Após período de incubação em estufa bacteriológica por 48 horas (37°C), é avaliado o número de colônias revertentes por placa (Vargas et al., 1993).

Sabe-se que muitos carcinogênicos químicos, como os HPAs são biologicamente inativos até que sejam metabolizados a formas ativas. Como os procariontes não apresentam capacidade de metabolização através de sistema próprio, um sistema exógeno de ativação de fígado de rato é adicionado ao agente químico a ser testado e à bactéria (Mortelmans & Zeiger, 2000).

Kado et al. (1983), propôs uma simples modificação no protocolo do teste de Ames, criando o método de microssuspensão. Este apresenta maior sensibilidade que o teste original, sendo a linhagem teste, concentrada em 10 vezes o crescimento original, o que permite avaliar a mutagenicidade em pequenas quantidades de amostras.

As diferentes linhagens de *Salmonella* podem fornecer informações sobre diferentes classes de mutágenos presentes nas amostras (Ohe et al., 2004). O teste de Ames é sem dúvida o bioensaio mais utilizado na pesquisa de mutagênese ambiental, especialmente para avaliações de misturas complexas, tais como, extratos orgânicos de solo, ar e água (White & Claxton, 2004).

No Brasil, o teste de Ames tem sido amplamente utilizado para avaliar o ambiente aquático, como reportado por Tagliari et al. (2004), que analisou sedimento da bacia hidrográfica dos rios Cadeia e Feitoria no Rio Grande do Sul, em área influenciada por curtume, cuja problemática são os efluentes ricos em cromo que contaminam os rios. Umbuzeiro et al. (2001), analisaram diferentes amostras de águas superficiais de bacias hidrográficas no estado de São Paulo, um dos estados mais desenvolvidos e industrializados do Brasil, e mostraram a eficiência em detectar agentes mutagênicos em misturas complexas. Vargas et al., (1993, 2008) relatando estudos em águas superficiais da bacia hidrográfica do Caí na área de influencia petroquímica, ressalta a sensibilidade do ensaio a esses compostos. Devido ao grande risco à saúde humana, a água de abastecimento possivelmente contaminada também é avaliada pelo teste de Ames, como descrito por Pereira et al. (2007). Compartimentos como solo e ar, são também avaliados, como reportado por Vargas et al. (2003); Coronas et al. (2008) e Da Silva Júnior & Vargas (2009).

1.6 Ensaio de *Allium cepa*

Entre os bioensaios de genotoxicidade, os testes citogenéticos em células vegetais oferecem uma série de vantagens, como: a) as técnicas de detecção são de rápida execução e baixo custo; b) o ciclo de vida de muitas plantas é curto, o que permite verificar os efeitos em gerações subseqüentes; c) vários indicadores podem ser usados, como, variações cromossômicas, mutações gênicas, alterações foliares, nos embriões e nos grãos de pólen; d) os modelos utilizados para análise de alterações cromossômicas empregam vegetais que dispõem de cromossomos grandes e em pequeno número, o que os tornam convenientes para análise citogenética; e) podem ser usados para estudos *in situ* ou *ex situ*. Várias pesquisas - como os estudos de FISKESJÖ (1988) - mostram correlação positiva entre os efeitos observados nas plantas e aqueles observados em modelos de mamíferos, o que facilita detectar a atividade genotóxica, uma vez que a utilização de modelos animais faz-se muitas vezes, complexa, dispendiosa e morosa (GRANT, 1994).

O emprego de vegetais como organismos teste tem sido indicado e validado por diversas agências de proteção ambiental, como o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), Organização Mundial da Saúde (WHO) e a US EPA. Dentre as plantas utilizadas no estudo de biomonitoramento, algumas espécies apresentam respostas mais adequadas. O gênero *Allium*, especialmente a espécie *Allium cepa*, tem mostrado ser uma espécie eficiente para tais estudos, principalmente quando é utilizada para avaliar danos cromossômicos e distúrbios no ciclo mitótico. Tais organismos teste têm sido validados em estudos colaborativos que mostram a eficácia destes para o monitoramento da mutagenicidade ocasionada por agentes ambientais poluidores (Fernandes et al., 2007).

A utilização do sistema teste de *Allium cepa* foi introduzido, por Levan, em 1938, quando investigava os efeitos da colchicina. Desde então, o teste de *Allium* tem sido frequentemente empregado para avaliar misturas complexas, como água de rio ou efluentes industriais. O método foi modificado por Fiskesjö, em 1985, e também, por Rank e Nielsen, em 1993, propondo modificações que tornam o teste mais eficaz para avaliar tais amostras e, até o momento, a metodologia tem sido utilizada com sucesso (Fiskesjö, 1985; Ma et al., 1995; Leme & Marin – Morales, 2009).

O material de estudo no teste de *Allium* são as células dos meristemas das raízes que, desde o início dos anos 30, são empregadas em estudos de clastogenicidade de agentes físicos e químicos. As células meristemáticas constituem um conveniente sistema para avaliação microscópica de alterações cromossômicas por apresentarem cromossomos grandes que facilitam a análise. O teste de *Allium* possibilita estudar as atividades citotóxica, genotóxica e mutagênica por meio de parâmetros avaliados como aberrações cromossômicas e micronúcleo (Ma et al., 1995). Ma et al., em 1995, propuseram modificações para analisar efeitos mutagênicos, observando micronúcleos também em células F1 expostas a poluentes ambientais.

Ambas as análises em células meristemáticas e em células F1 de *Allium cepa* têm atualmente sido reportadas na literatura como eficientes indicadores de ação direta sobre o DNA. De acordo com Leme e Marin – Morales (2009), a análise de aberração cromossômica juntamente com a análise de micronúcleo em células meristemáticas são avaliações tão eficazes quanto a análise de micronúcleo em F1. Além de aberrações cromossômicas e

micronúcleos, que avaliam respectivamente a atividade genotóxica e mutagênica, células em divisão também são quantificadas a fim de avaliar a citotoxicidade do poluente.

As aberrações cromossômicas são caracterizadas por mudanças na estrutura cromossômica ou no número de cromossomos, que podem ocorrer espontaneamente e/ou como resultado de exposição a agentes físicos e químicos. Alterações estruturais podem ser induzidas por diversos fatores como quebras, inibição da síntese de DNA, bem como replicações de DNA alterado. As aberrações numéricas, por exemplo, aneuploidias e poliploidias são conseqüências de segregação anormal de cromossomos. Os micronúcleos são considerados, por muitos autores, como o parâmetro mais eficiente e simples para analisar o efeito mutagênico. Isso se deve ao fato de eles resultarem de danos erroneamente reparados, ou até mesmo não reparados nas células parentais, sendo facilmente observados nas células filhas como uma estrutura similar ao núcleo principal. Os micronúcleos aparecem a partir do desenvolvimento de algumas alterações cromossômicas, por exemplo, quebras e perdas cromossômicas (Leme & Marin – Morales, 2009).

Muitos pesquisadores que têm empregado vegetais para avaliar a genotoxicidade em amostras ambientais mostram que estes organismos teste são capazes de ativar mutágenos pela presença de um sistema oxidativo enzimático próprio. Este sistema também oferece opções de exposição direta no sedimento e em seus extratos e elutriatos. Os tecidos de plantas também podem ser expostos diretamente em solo, tanto in situ quanto ex situ, ou extratos aquosos e lixiviados (Fiskejo, 1985; White & Claxton, 2004; Ohe et al., 2004).

Rank & Nielsen (1998) utilizaram o sistema teste de *Allium* também para avaliar o esgoto em diferentes usinas de tratamento, na Dinamarca, e relacionaram a ação de diferentes metais pesados que o compunha com as aberrações cromossômicas encontradas. Leme & Marin – Morales (2008) empregaram o bioensaio para avaliar, através de células meristemáticas e F1, a qualidade da água de rio contaminado por petróleo. Ambos os trabalhos provaram que a *Allium cepa* foi sensível para as análises propostas.

1.7 Área de Estudo

A bacia hidrográfica Taquari – Antas situa –se na região nordeste do estado do Rio Grande do Sul, abrangendo uma área de 26.428 km², equivalente a 9% do território estadual, onde 98 municípios estão inseridos total ou parcialmente. Limita-se ao norte com a bacia do rio Pelotas, a oeste e ao sul, com a bacia do rio Jacuí e, a leste, com as bacias dos rios Caí e Sinos. Trata-se do principal afluente do rio Jacuí, maior formador do Guaíba (Figura A).

O rio Taquari segue a direção predominante norte-sul, apresentando uma extensão de 140 km e uma declividade média de 0,2 m/ km. Caracteriza-se como um rio de planície, com pouca declividade e raras corredeiras.

Neste trabalho, enfatizou-se avaliar região da bacia que está em área de influência de sítios com passivo de solos contaminados por químicos utilizados na preservação da madeira de uma usina instalada à margem esquerda do rio Taquari, no distrito de Barreto, município de Triunfo (RS). Foi constatado, por estudos prévios, a contaminação do solo e do lençol freático do sítio desta usina pelos biocidas empregados durante o funcionamento.

A área total do terreno da usina é de 18 hectares, contendo uma área construída de 1.417 m². A unidade operou de 1960 a 2005, no beneficiamento e exploração comercial de postes de iluminação elétrica. Empregando, de 1960 a 1982, soluções de PCP e creosoto, após proibição do PCP em 1985 pela portaria n° 329 do Ministério da Agricultura (Ministério da Agricultura, 1985), utilizou-se, de 1982 a 1998, o creosoto alternado com o CCA. Após proibição do creosoto em 1998, pelo Decreto – Lei n° 264 /1998 do Ministério da Economia (Ministério da Economia, 1998), a usina passou a operar utilizando apenas o CCA até 2005, quando cessaram suas atividades.

A área apresenta colinas suaves que não ultrapassam 100 metros, está compreendida sobre a planície de inundação do rio Taquari e em zona principal de descarga das águas subterrâneas e superficiais. Ocorrem alguns corpos d'água associados, que percorrem a área em direção à drenagem principal, formando sub – bacias. A topografia da área é essencialmente plana, com pequena declividade sentido oeste-noroeste (Figura B).

A área é composta por rochas sedimentares, arenitos finos a muito finos com intercalações de lamitos (argilitos e folhetos). Parte destas seqüências sedimentares antigas ocorrem cobertas por espessuras variáveis de materiais inconsolidados, areias, cascalhos e lamas.

O sistema aquífero local é do tipo poroso freático (livre) e superficial (profundidade do nível da água entre 1,6 m e 5 m) contido em depósitos formados pelos materiais inconsolidados. Estudos mostraram que seu deslocamento é em direção à drenagem principal. O clima desta região é classificado como subtropical úmido, com temperatura média variando entre 19°C e 19,8°C.

Na região do entorno da usina, situam – se algumas residências e estabelecimentos comerciais de pequeno porte, além de culturas agrícolas. Na margem direita do rio Taquari, a totalidade da área de entorno é utilizada para fins agrícolas. Estudos para avaliação das questões de uso e ocupação do solo revelaram que, desde a década de 60 até os dias de hoje, a atividade agropecuária é predominante na região.

Os postes de madeira eram tratados empregando a técnica de célula cheia, através da aplicação do biocida em autoclave. Após a impregnação da madeira com o químico, os postes permaneciam gotejando em local apropriado. Entretanto, a madeira saía ainda úmida deste local e era armazenada em outra localidade, dentro da usina, sem tratamento impermeabilizante, diretamente no solo, por aproximadamente 12h até serem vendidos.

Independente desse passivo de contaminação ainda existem pontos ativos como (1) cerca de 200 tambores de 100 litros cada, com resíduos de preservativo de madeira enterrados na área, (2) cerca de 20.000 litros de resíduo onde se preparava a solução preservativa (3) estimativa aproximada de 209,2m³ de resíduo em lagoa de decantação que servia como receptora da drenagem pluvial e efluentes provenientes do tratamento de madeira, entre outras fontes ainda não desativadas.

Portanto, as características físicas da área indicam uma alta suscetibilidade quanto ao potencial risco de contaminação de solo, água subterrânea e águas superficiais. Tendo em vista a proximidade de um importante rio, a presença de atividades agrícola e pecuária associadas, à vizinhança de estabelecimentos residenciais e comerciais, o risco ao ecossistema e à saúde humana pode ocorrer.

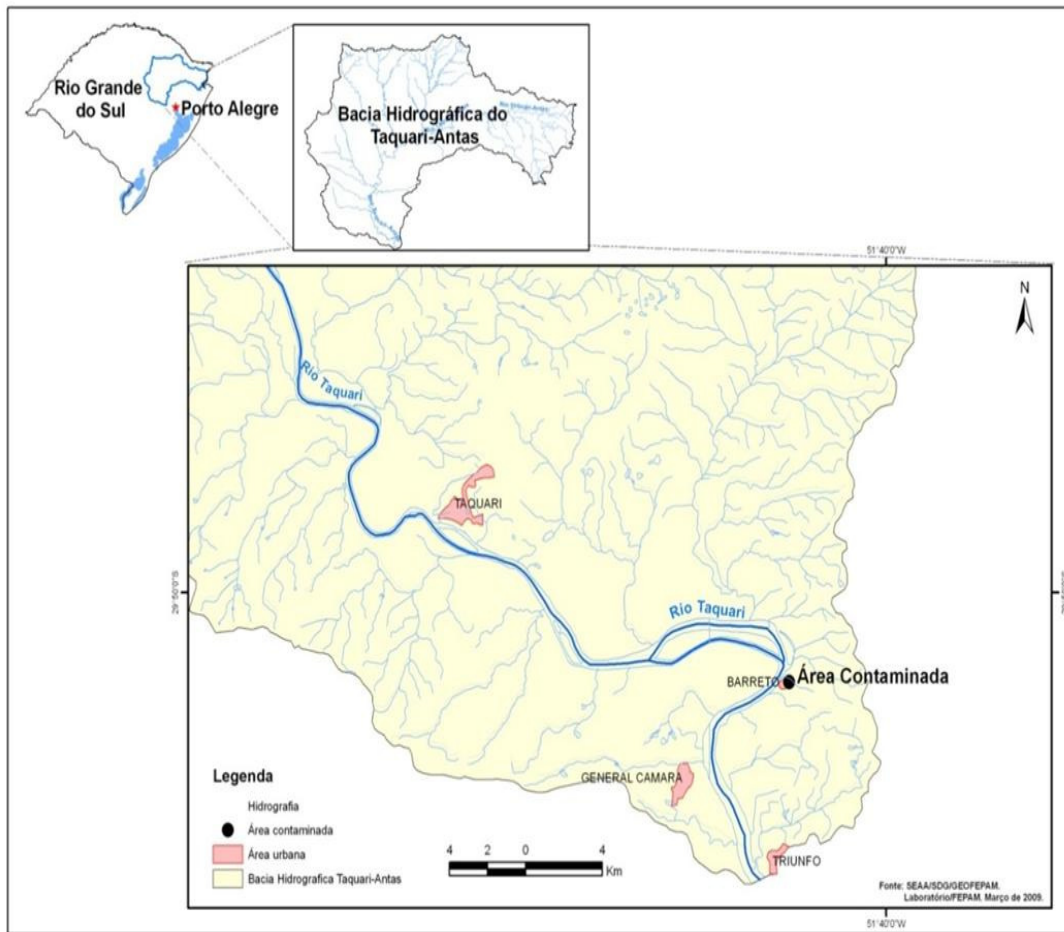


Figura A: Localização da Bacia Hidrográfica Taquari – Antas e do sítio de solo contaminado as margens do Rio Taquari.

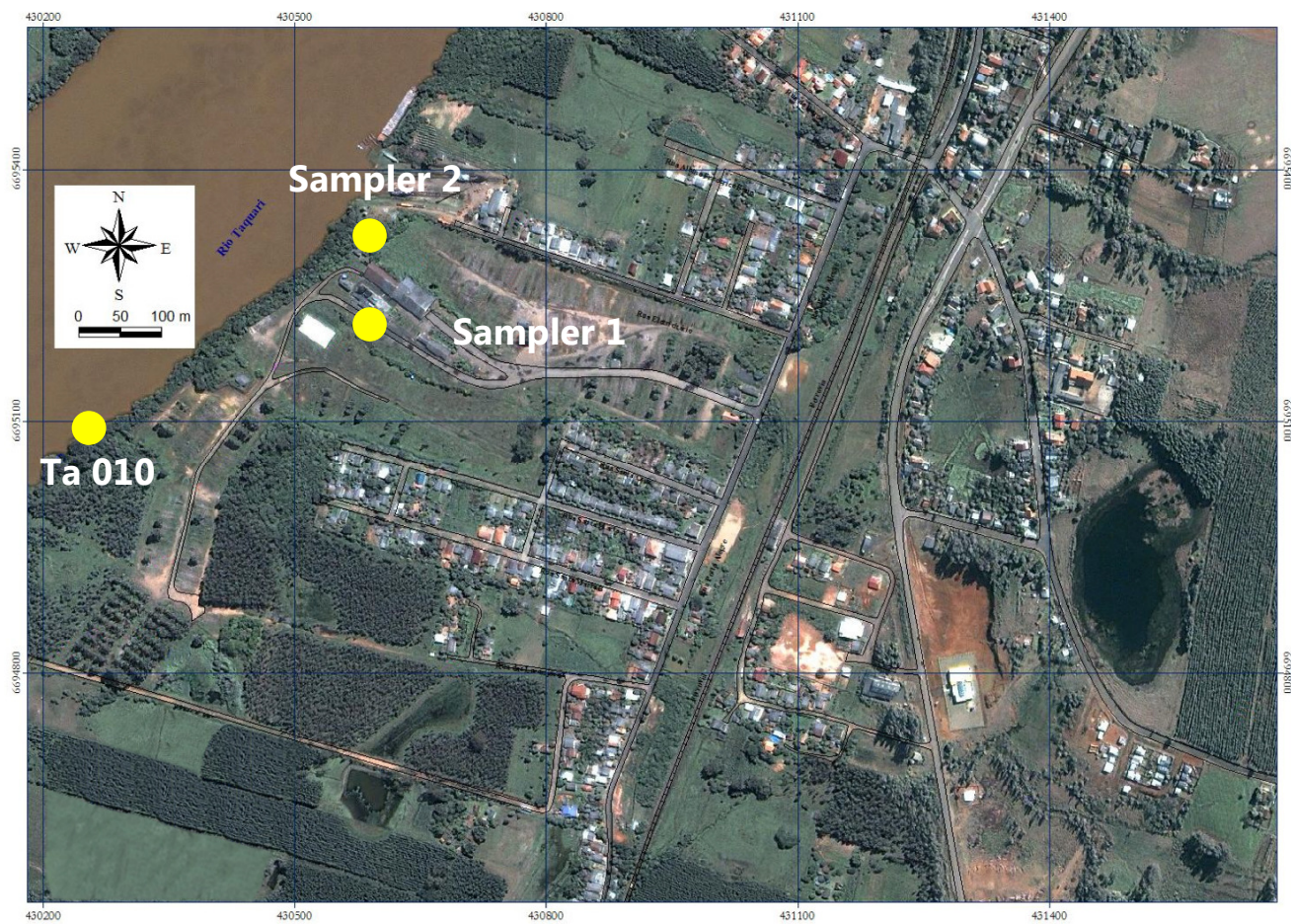


Figura B: Área da Usina as margens do rio Taquari.

2 OBJETIVOS

O trabalho procurou realizar diagnóstico do sedimento do rio Taquari, em área sob influência de sítio de solo contaminado por substâncias químicas utilizadas na preservação de madeira, empregando ensaios para avaliação genotóxica como parâmetros precoces no diagnóstico da qualidade ambiental.

Os objetivos específicos buscaram:

- Caracterizar o potencial genotóxico da drenagem superficial de solo proveniente do sítio contaminado, após eventos de chuvas fortes, através do ensaio *Salmonella*/microsoma.
- Investigar atividades mutagênicas em extratos orgânicos de sedimentos e amostras de água intersticial na área sob influência de sítio de solo contaminado no rio Taquari, através do ensaio *Salmonella*/microsoma;
- Avaliar a mutagenicidade e genotoxicidade das amostras de sedimento através do bioensaio com *Allium cepa*.
- Relacionar atividade genotóxica, composição química da amostra e rotas de dispersão de poluentes do solo para o rio principal em períodos de estiagem e alta pluviosidade;

O presente estudo é parte integrante do projeto “Estratégias ecotoxicológicas para caracterizar áreas contaminadas como medida de risco à saúde populacional, MCT-CNPq/ CT- SAÚDE”, em andamento na FEPAM, com apoio financeiro do CNPQ.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico “*Mutagenicity activity in a river basin under influence of contaminated soils with wooden preservative*”, foi desenvolvido a partir dos resultados obtidos neste trabalho.

O trabalho visou investigar possível atividade mutagênica em amostras de sedimento do rio Taquari e de amostras provenientes de escoamento superficial de solo, em área que sofre influência de sítio de solo contaminado por substâncias utilizadas na preservação de madeira, localizado na região nordeste do Rio Grande do Sul, Brasil.

Mutagenicity activity in a river basin under influence of soils contaminated with wood preservatives

Thatiana Cappi da Costa^{a,b}, Kelly Cristina Tagliari de Brito^a, Jocelita Aparecida Vaz Rocha^a, Karen Alam Leal^a, Silvia Tamie Matsumoto^c and Vera Maria Ferrão Vargas^{a,b*}

^aPrograma de Pesquisas Ambientais, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM), Avenida Salvador França, 1707 CEP: 90690-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cLaboratório de Mutagênese Ambiental *in vitro* e *in vivo*, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Av. Fernando Ferrari, 514, CEP 29075 – 910, Vitória, ES, Brazil.

*Programa de Pesquisas Ambientais, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM), Avenida Salvador França, 1707 CEP: 90690-000, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33346765; fax: +55 51 33346765. ecorisco@fepam.rs.gov.br

Artigo a ser submetido à revista Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

Abstract

Mutagenic activity, using *Salmonella*/microsome and *Allium cepa* bioassay, was employed as markers to detect pollutant dispersion routes in contaminated soil site covered by water bodies associated with the drainage toward the river. The site of the present study comprises an area located along the banks of the Taquari River, in the city Triunfo (RS) belonging to the Taquari - Antas river basin with identified environmental contaminants (pentachlorophenol, creosote and hydrosalt CCA). The *Salmonella*/microsoma test evaluated organic extracts of the material drained into the water body after significant rain events as well as Taquari River samples including organic sediment extract, interstitial water and gross sediment. In the *Salmonella*/microsome test, different strains enabled evaluation of different DNA mutations including frameshift (TA97a and TA98) and base pair substitution (TA100) in the absence (-S9) and presence (+S9) of metabolic activation. The *Allium* test allowed verification of chromosomal alterations. Positive mutagenicity results in the *Salmonella*/microsome assay of material from the area indicate that contaminant mixtures may have drained into the Taquari River, as indicated by mutagenic activity detected in both bioassays in sediment samples collected at the contaminated site. Mutagenic activity was also detected at a site downstream from the contaminated site. Although the reference area upstream showed low mutagenic activity originating from a different pollutant source, such pollutants were not found at the downstream sites. The bioassays employed, mainly the *Salmonella*/microsome assay, can indicate a possible contamination route toward the Taquari River and were proven efficient at evaluating the mutagenicity of drained soil material and sediment from the river.

Keywords: *Salmonella*/microsome assay; *Allium cepa* test; wood preservation; contaminated soil site.

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), process number 555187/2006-2 and Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM).

3.1 Introduction

Wood preservation is an important industry that offers treatment against biological effects that lead to degradation and decomposition of wood. Throughout the world, wood may be attacked by pathogenic agents such as xylophagous insects or lignivorous fungi [1]. The importance of wood preservation in Brazil is related to the reduction of pressure on native forests, so that increasing the useful life of the wood enables greater conservation of the natural forest resources [2].

The most widely used method to prevent xylophagous attack is the introduction of chemical substances that are toxic to these organisms [3]. Currently, the most widely used wood preservative is chromate copper arsenate (CCA), which has replaced alternative organic preservative types such as pentachlorophenol and creosote due to environmental and human health concerns [4].

The risk of wood preservative transference into the aquatic environment has been recognized as very high in such areas [1]. Most of the chemicals released into the surface water are carcinogens and become the components of complex environmental mixtures [5,6,7]. Also, the entrance of persistent mutagens into sediment can generate a reservoir of mutagenic hazard that can be continually reintroduced into the water column via resuspension and trophic transfer [8]. The components of complex environmental mixtures can have adverse health effects on the indigenous biota and humans [7,9].

Introduction of chemical substances by anthropic activities has resulted in contamination problems at sites. Currently around the world, there are many sites that contain soils polluted with heavy metals and organic contaminants including aromatic polycyclic hydrocarbons (PHAs). Inventories performed by national environmental agencies of the countries revealed thousands contaminated sites, of which 60,000 are in the United States and

Canada. Sao Paulo, the most industrialized state in Brazil, by itself contains more than 2,272 cataloged contaminated sites [10,11]. Many countries, among them Brazil, have felt the necessity to pass legislation to manage contaminated areas. In 2010 resolution number 420 of the National Environmental Council (CONAMA) was created to regulate the soil quality [12].

The harm inflicted by contaminated sites on the ecosystem, justifies the importance of investigating them. The use of biomarkers for monitoring environmental quality has gained considerable interest in the assessment of many sites around the world [13]. Many of the studies investigating the genotoxic hazards of surface water, aquatic sediments and soil have employed bioassays, including the *Salmonella* mutagenicity test and *Allium cepa* test [6,8,10,14].

The *Salmonella* microsome assay (Ames test) is a widely accepted short – term assay for identifying substances that can produce genetic damage [14]; It is used worldwide to detect the mutagenicity of biological mixtures as water, sediment, atmospheric environmental samples and chemicals [7,15,16,17]. Analyses of eukaryotes have enabled the detection of a great variety of damage, varying from gene mutations to chromosome damage and aneuploidies. Higher plants present characteristics that make them excellent genetic models to assess environmental pollutants, and are frequently used in monitoring studies [18]. Among the plants employed in biomonitoring studies, some species, especially *Allium cepa* from *Allium* genus, present more adequate response [19].

The present study aimed diagnose the Taquari River sediment, in an area under the influence of a soil site contaminated by chemicals substances used in the wood preservation industry. This treatment station operated until 2005 and treated a high volume of wooden poles and consequently, produced chemical residues that are dangerous to the environment. The area is potentially a highly important source of pollutants to the natural resources (water

and soil). The present study intends to define the contribution of rainfall drained routes dispersing genotoxic contaminants from the contaminated site to the main river. Employing genotoxicity bioassays by means of early parameters enabled, the diagnosis of environmental quality.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Sampling site

The study was performed at the Taquari River, belonging to the Taquari-Antas basin, located in northeast Rio Grande do Sul state, which extends 140 km along a north – south path (Fig. 1). The river is characterized as a flat with little declivity, rare rapids, and wide outflow, and serves diverse purposes such as supplying water, irrigation, recreation, fishing and others [20].

The study area is impacted by site where soil is contaminated by substances used by a wood preservation plant located near the banks of the Taquari River. The area is covered by associates water bodies that drain toward the main body, thus forming sub-basins. The river also is connected to underground water that comes from the area.

In the active period of the plant, from 1960 until 2005, wood preservatives including pentachlorophenol, creosote and hydrosalt CCA (Chromated copper arsenate) were employed. The region is next to a housing nucleus and agricultural crops. Early chemical analyses of the industrial area confirmed contamination of underground water by polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), Cr, Ar, pentachlorophenol, dioxins and furans some of them at levels exceeding the standards defined as acceptable by Brazilian legislation [12,21,22].

3.2.2 Sediment proceeding from contaminated site

Two sampler types were prepared in neutral glass and installed inside the contaminated soil site, with a purpose of evaluating the draining of organic compounds from the soil in the enterprise area (Fig. 2).

One of them was placed on the surface of the soil (Sampler 1), in a flat area with the best draining condition ($29^{\circ}52'17.82''\text{S}$ $51^{\circ}43'7.83''\text{W}$)(Fig. 3-A). This location was used as a depot for treated wood and thus presented the possibility of contaminating the soil. The sample characterizes the eroded material after rainfall events proceeding from the plateau where the treatments of wood poles occurred.

In agreement with hydric studies, the other sampler (Sampler 2) was lodged inside the stream that crosses the site that drains toward the Taquari River ($29^{\circ}52'14.19''\text{S}$ $51^{\circ}43'06.7''\text{W}$)(Fig. 3-B). For biological analyses of sediment originating from the contaminated soil site, continuous sampling of fine sediments in suspension was carried out and the accumulated material was removed after a significant rainfall event, thus composing an integrated sample from the period. The samples obtained represent the material in suspension that was exported from the contaminated area.

Both samplers were installed in December 2007 and had material collected in two periods, first in August 2008 (winter) and the second in October 2008 (spring) always after a considerable rainfall episode. The second sampling presented higher mean relative humidity, temperature and than the first sampling (Fig. 4). The samples of water and sediment were placed in glass flaks and kept on ice until they arrived in the laboratory, where they were kept frozen until analysis.

3.2.3 Taquari River sediment collection

Three sampling points in the Taquari River were chosen for the study: one in the city of Taquari as the reference area, Ta 032 (29°48'19.2"S 51°52'50.2"W), another in the city of Triunfo at the site contaminated by wood preservative, Ta 010 (29°52'23.9"S 51°43'21.99"W), and the third in the city of General Câmara, Ta 006 (29°54'09.7"S 51°45'05.1"W). The numbers show the distance from the mouth in kilometers (Fig. 1). The areas are located in the south region of the Taquari-Antas basin, at an altitude of 6-100 m above sea level, with a 0-3 % slope.

The areas are flat and favor the development of annual crops including, as maize, soy, wheat and rice. There is also as focus on cattle and the cultivation of species such as Acacia, Eucalyptus and Pinus. In vicinity of hydric courses are found native species that constitute the riparian formation [23]. In particular, the Ta 032 area is used for entertainment while the Ta 010 site suffers the influence of a contaminated area for substances used in wood preservation, with possible contribution of organic pollutants and heavy metals, which flow towards the Taquari River while Ta 006 is used for agricultural activities (rice).

The first sediment sampling was performed in December 2007 (summer) and the second in September/2008 (winter) to study mutagenicity. In both episodes the means for relative humidity were similar while the respective mean temperatures in summer and winter were 24°C and 15°C. Also mean precipitation data revealed that December 2007 was drier than September 2008 (Fig. 4).

The sediment samples were collected according to the standard method, at about 20 cm from the riverbed in a compound sampling placed in glass flasks and kept on ice until they arrived in the laboratory, where they were kept frozen until analysis [15,24]. The granulometric characterization of sediment samplings presented simple classifications, where

in the first sampling Ta 032 was classified as sandy with mud, Ta 010 as muddy and Ta 006 as muddy with sand. In the second sampling Ta 032 was classified as cascade with sand, Ta 010 as muddy with sand and Ta 006 as muddy with sand (Fig. 4).

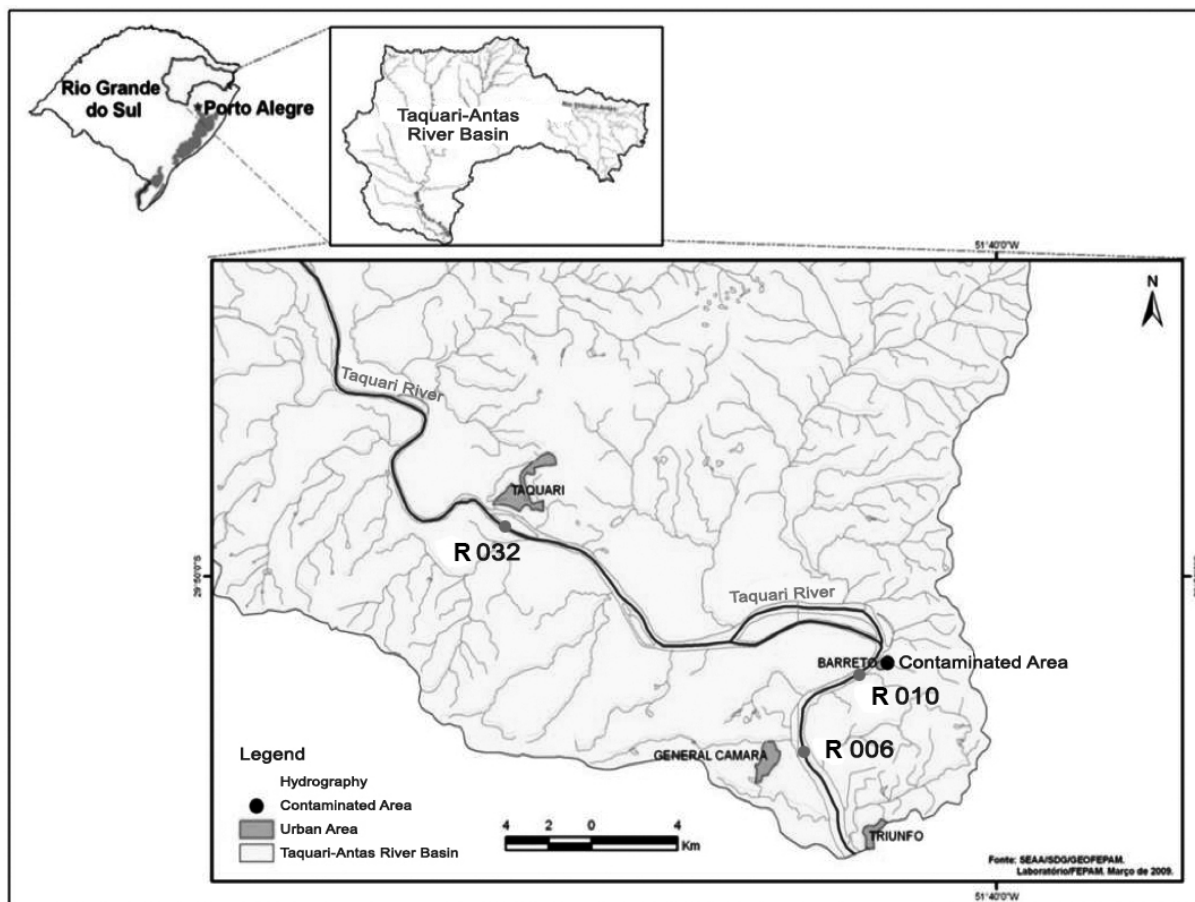


Fig. 1. The Taquari-Antas river basin, sampling areas in the Taquari River, Ta 032, Ta 010 and Ta 006: the numbers show the distance from the mouth in kilometers.

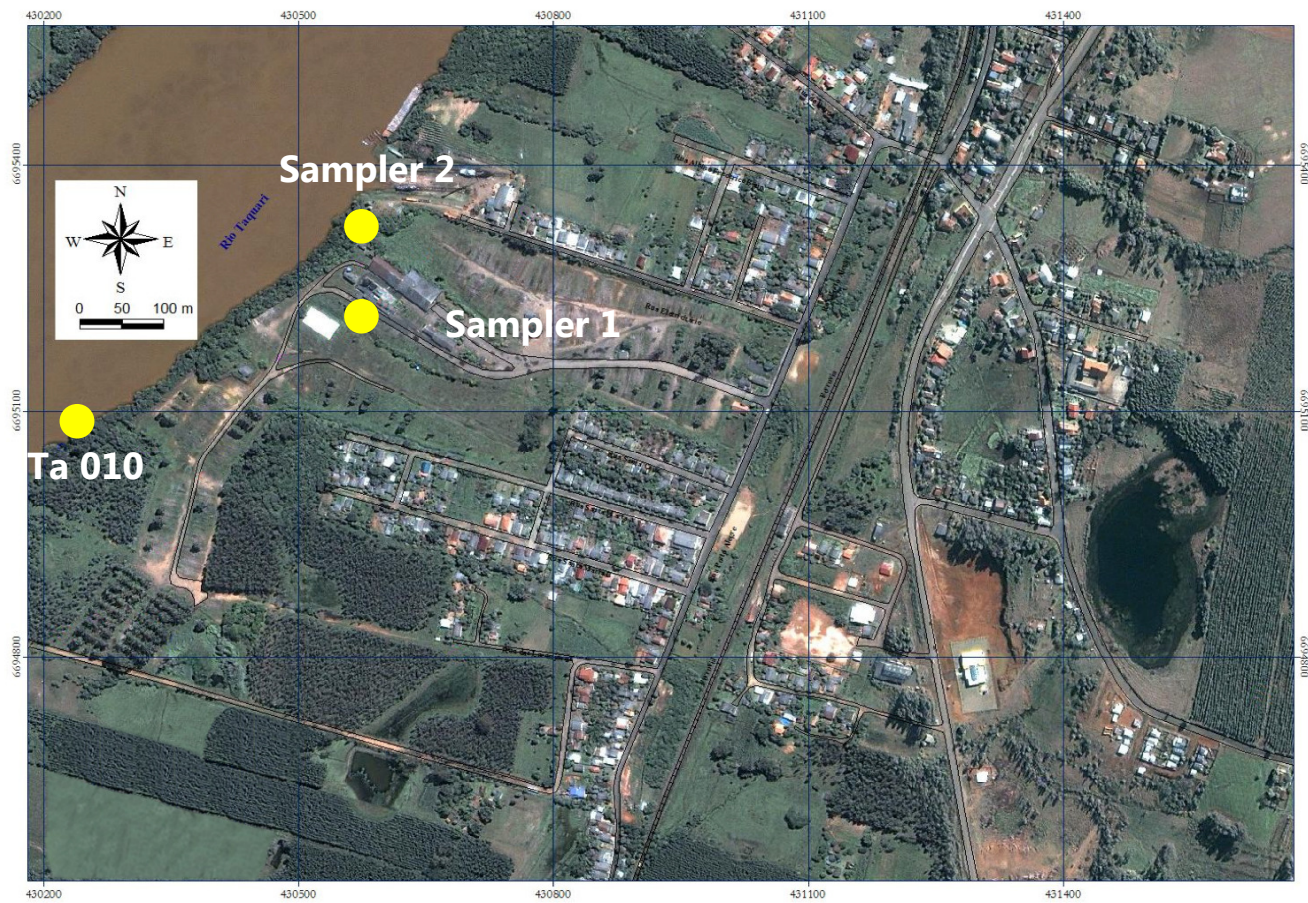
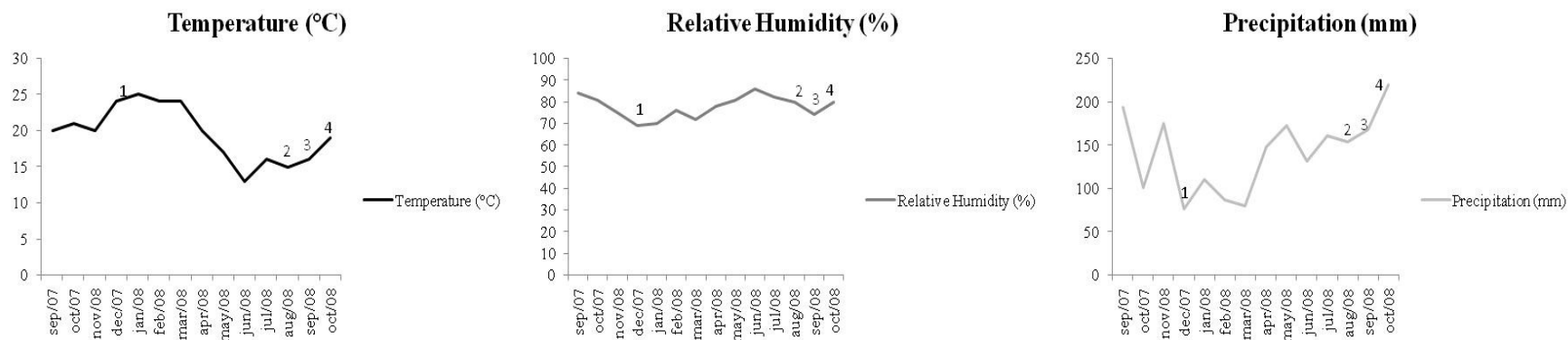


Fig. 2. Internal Area of the wood plant. Sample localization: Ta010 in the river, Sampler 1 in the soil and Sampler 2 in the water body.



Fig. 3. **A** – Sampler 1, installed on the soil surface of contaminated area. **B** – Sampler 2, placed inside of water body that crosses the contaminated site.



1 First sediment sampling from Taquari River. **2** First sampling of soil drainage after a significant rainfall event. **3** Second sediment sampling from Taquari River. **4** Second sampling of soil drainage after a significant rainfall event.

Granulometric classification by simple frequency (%)						
	Dec/2007 Sampling			Oct/2008 Sampling		
	Ta 032	Ta 010	Ta 006	Ta 032	Ta 010	Ta 006
CASCADE	0.0	0.0	0.0	51.8603	0.0	19.2963
SAND	52.4990	12.7000	28.0710	48.1397	38.0376	38.2476
SILT	35.7561	73.6746	62.8535	0.0	51.8012	34.2001
CLAY	11.7449	13.6255	9.0754	0.0	10.1612	8.2560

Fig. 4. Mean meteorological data for: relative humidity, temperature and precipitation in the study period (December/2007 to October/2008) and granulometric classification of Taquari River sediment samples (Ta032, Ta010 and Ta006) in two samplings.

3.2.4 Sample preparation

3.2.4.1 Organic extract liquid - liquid

The liquid parts of superficial soil drainage samples were submitted to a previously described organic extraction procedure [25] with modifications. Two extraction steps were performed with an 800 ml sample of superficial soil drainage, using pesticide –grade dichloromethane solvent (CASRN 75-09-2), resulting in sample fractionation into extracts of compounds having affinity with neutral and acidic pH. The first step was to add dichloromethane, manually shake for 2 minutes and extract the neutral fraction, filtering them in glass wool with sodium sulfate. This procedure was repeated 2 times. The second step was to acidify the same sample (pH 2) with sulfuric acid (1:1) employing a similar procedure for extracting the acid fraction. The EOM (extract organic mass) was measured on an analytic balance and used to define the sample dilutions.

3.2.4.2 Sediment organic extracts

The organic extracts of sediment from the Taquari River originating from soil site were obtained to analyze mutagenicity as described in previous papers [15,24]. The sediment samples (50g) were filtered in glass wool with sodium sulfate. The solvent dichloromethane (CASRN 75-09-2) was added, mixed and sonicated for 5 min at 100W to extract moderately polar fractions. This operation was repeated five times and the resultant filtrate passed through a chromatographic column containing sodium sulfate and celite. The extract was concentrated in a rotary evaporator (40°C), stored at -20°C for up to 14 days, and assessed for density. At the time of analysis, the extracts were dried by evaporation under a nitrogen gas flow and resuspended in dimethylsulfoxide (DMSO—Riedel-de Haën, CASRN 67-68-5), spectrophotometric grade. In the second sampling of sampler 2 (October 2008) the use of a

duplicate of the initial sample was necessary due to the concentration of small organic matter in the sediment (100g).

3.2.4.3 Interstitial water and gross sediment

The sediment samples from the Taquari River were centrifuged at 10,000 X g, for 10 min at 4°C to extract interstitial water. The extracted water was filtered using a 0.45µm Milipore filter, divided into aliquots and frozen at - 20°C to evaluate the mutagenicity. For the Ames test, the samples were sterilized in a 0.22µm Milipore filter [26]. These filters were submitted to extraction procedures (after the samples were filtered, the compounds adhering to the filters were extracted with water and DMSO) for analysis of the presence of possible mutagens capturing during the filtration process. The river sediment samples were frozen to evaluate the mutagenicity by the *Allium cepa* test.

3.2.5 Mutagenicity Assays

3.2.5.1 *Salmonella* microsuspension bioassay

The mutagenicity of interstitial water, sediment organic extracts and organic extract liquid – liquid (superficial soil draining) was evaluated using the *Salmonella*/microsome assay through the pre – incubation method. In this study the following 3 strains of *Salmonella typhimurium* were used: TA98 (*hisD3052, frameshift GC, rfa, Δuvrb, pKM101*), TA97a (*hisD6610, frameshift GC, rfa, Δuvrb, pKM101*) and TA100 (*hisG46, base- pair substitution GC, rfa, Δuvrb, pKM101*). The TA98 and TA100 strains are generally employed as standard strains to provide a screening response, whereas TA97a is most often indicated to evaluate the mutagenicity of heavy metals [27].

The interstitial water volumes evaluated were 50, 100, 150, 250 and 400 µL per plate, expressed as 0.05, 0.1, 0.15, 0.25 and 0.4 mL per plate; the liquid-liquid organic extract was

analyzed at volumes of 0.62, 1.25, 2.5, 5 and 10 μL expressed in 0.00125, 0.0025, 0.005, 0.01 and 0.02 L equivalent per plate, and the organic sediment extract assessment was performed at 2.5, 10, 40 and 80 μg concentrations per plate of organic extract obtained, expressed in g of dry sediment equivalents.

The *Salmonella*/microsome assay was performed with modifications [28], in the absence and presence of a rat hepatic microsomal fraction (S9 mix with 4% rat liver S9). The samples were incubated in a water bath without shaking, with 100 μL of the tester bacterial culture (1×10^{10} cells/ml) in the absence and presence of metabolic activation (100 μL) solution, for 90 min, in the dark, at 37°C. Plating was performed as previously described [29]. Cytological activity was also assessed via a survival curve of the test organism compared at different concentrations of the samples [15,24,29] or using background lawn analysis when the sample was not sufficient for all the assays [14, 30].

For all strains the mutagenicity and cytotoxicity were evaluated after 72h of incubation (37°C). The negative and positive controls were assessed concomitantly, with DMSO (spectrophotometric grade) or sterile deionized water being used as the negative control and sodium azide (SAZ) and 4-nitroquinoline oxide (4NQO) for positive control, according to strain in assays without S9mix, and 2- aminofluorene in the presence of S9 mix. The samples were considered positive for mutagenicity when the linear portion of the dose - response curve was significant via the software Salanal (Salmonella Assay Analysis) version 1.0 Research Triangle Institute, RTP, NC, USA.

The cytotoxic response was considered positive when the percentage of surviving cells was less than 60% of the colonies compared with the negative control in at least one dose or when thinning or absence of background lawn was observed [5,14,24].

3.2.5.2 *Allium cepa* Assay

The assay was carried out with *Allium cepa* seeds (variety Baia Periforme), that are genetically and physiologically homogeneous. The test consisted of evaluating the genotoxicity, mutagenicity, cytotoxicity and the toxicity parameters of meristematic cells.

The assay was performed according to a modified version of Grant's protocol [31]. In this study, two treatments were carried out, one with interstitial water and the other with gross sediment.

To evaluate interstitial water, several Petri dishes were covered with filter paper, then one hundred (100) onion seeds were germinated on each one, at room temperature ($20 \pm 5^\circ\text{C}$), with 5ml of distinct interstitial water sample. Deionized water (5ml) was used as a negative control and 5 ml of 4×10^{-4} M methylmethanesulfonate (MMS, Sigma – Aldrich, CAS 66-27-3) was utilize as positive control.

For analysis of direct sediment, onion seeds were germinated (100 seeds on each Petri dishes), at room temperature ($20 \pm 5^\circ\text{C}$), on several Petri dishes containing 15 g of gross sediment from each site added to 5 ml of deionized water. The negative and positive controls were performed in parallel. In the negative control the seed were germinated in the reference area with 5 ml of deionized water, and positive control consisted of adding 5 ml of 4×10^{-4} M methylmethanesulfonate (MMS, Sigma – Aldrich, CAS 66-27-3) to the reference area sediment. After germination, the roots were fixed in alcohol-acetic acid (3:1) for 24h. Slides were prepared with meristematic and F1 cells by the Feulgen methodology [19].

In the meristematic cells the mitotic index (MI) is the first category analyzed from the number of cells in division; this index was employed to evaluate the cytotoxicity. The mutagenic index (Mut I) is the second category analyzed from quantification of micronuclei

and chromosome breaks. The third category analyzed is the chromosome aberration index (CA) which identifies the genotoxic activity, evaluated from chromosome aberration analysis that considers several types of aberration within different cell division stages (metaphase, anaphase and telophase), including, chromosomes losses and bridges, laggard or vagrant chromosomes and other aberrations. Finally, the fourth category, the germination index (GI), is analyzed from the number of roots growing, to assess the toxicity. All the categories were analyzed by counting 5000 meristematic cells per site (500 cells per slide), comprising a total of 10 slides [32]. Micronucleus in F1 cells also were evaluated by counting 5000 cells per site. The results obtained in the different assays were analyzed using a non-parametric statistical analysis, the Kruskal-Wallis test. The statistics were analyzed via the software Bioestat version 5.0.

3.2.6 Chemical Analyzes

The chemical analyzes prioritized the organic compounds as PHAs by the standards of the Environmental Protection Agency of United States – US EPA [33]: acenaftilene, acenaftene, fluorene, fenantrene, antracene, fluorantene, pirene, benzo(a)antracene, crisene, benzo(b)fluorantene, benzo(k)fluorantene, benzo(a)pirene, indeno(1,2,3-cd)pirene, dibenz(a,h)antracene and benzo(ghi)perilene. The amount of sample used in the extraction was determined based on 3550C method of the Environmental Protection Agency of United States [34] that references distinct methodologies for analyzing PHAs in soil, taking into account the presence of low and high concentrations.

The description of the activities previously development in the region indicated that the approximate amounts of PHAs in the samples would be high. This information was essential to assist in choosing the methodology, which employed 2g of sample dry in sodium

sulfate, followed by the addition of dichloromethane for 3 minutes in ultrasound. After the sample was filtered, the volume was reduced by nitrogen gas. Subsequently, the extracts were cleaned using a silica gel column, eluted with hexane/ dichloromethane and reduce to a volume to 1ml. The extract was analyze by a gas chromatograph connected to a mass spectrometer (US EPA TO 13-A), using external standardization

3.3 Results and Discussion

3.3.1 Assessment of superficial soil drained proceeding from contaminated soil site

Several studies [6,7,24] have reported the presence of xenobiotics of organic origin and genotoxic activity in aquatic environments. Studies identifying the chemical fractions that are mutagenically reactive to *Salmonella* have shown that much of the mutagenic activity of several complex mixtures is caused by compounds within one or a few classes of chemicals present in the mixture of PAHs, pesticides, heterocyclic amines and heavy metals [7].

Previous studies confirm the presence of heavy metals, PHAs, dioxins and furans, some of them in amounts above the legal limits permitted for intervention in the soil of the site studied. Those soils become a diffusive source of these contaminants, which can be transported to Taquari River sediment.

As a marker to define the route by which the pollutants are dispersed, the mutagenicity activity of the eroded material after rainfall events was evaluated by the *Salmonella* microsuspension bioassay using the TA98, TA97a and TA100 strains, in the presence and absence of metabolic activation. The organic extract analysis was chosen due to the low sample amount obtained by these samplers and the known sensitivity of the Ames test to organic compounds such as PHAs, heterocyclic compounds and aromatic amines [10].

Results of mutagenic activity in the liquid-liquid and sediment organic extract of superficial soil drainage samples are summarized in Table 1.

In the August 2008 sampling of organic liquid-liquid extract, Sampler 1, in the absence of metabolic activation, tested positive for mutagenicity, detected by frameshift mutation (TA98 and TA97a strains) and base-pair substitution (TA100 strain) while in the second, October 2008 sampling, only TA98 without S9 mix was positive. Sampler 2 was negative for mutagenicity in both sampling. Cytotoxic effect was detected by Sampler 1 in October and by Sampler 2 in August sampling, both with S9 mix.

Sediment organic extract was assessed only in Sampler 2, due to a lack of sufficient sediment in Sampler 1 and tested negative in the first sampling (August 2008) and positive in two strains (TA98 and TA97a) in the presence of metabolic activation at October sampling, this response indicate not only frameshift mutation but also that the organic pollutants are accumulated in the sediment and undergo biotransformation. Cytotoxic activity was found only at the highest dosage in the first sampling at all dosages tested in the second sampling.

According to a prior study [29], the mutagenic potency is expressed by the sum of the results for strains employed in *Salmonella* microsuspension assay, in the absence and presence of S9 mix. Results of water and sediment organic extracts from drained soil material were organized and displayed in Fig. 5, which summarizes the frameshift (TA98 and TA97) and base-pair substitution mutations (TA100) according to site and sampling. By comparing these results to precipitation event levels, it can be observed that: (1) Sampler 1 presented greater diversity of direct mutagenicity in the first rainfall event than in the second; (2) for the water extracts, probably due to the dry period, the accumulation of these pollutants in the superficial soil layers were released in the first significant rainfall event, resulting in a more concentrated sample than the second one; (3) the lack of positive response in the organic

water extract in Sampler 2 can be explained by the flow and location of the stream, and by the fact that it disperses the pollutants towards the main river; (4) compounds of low solubility can be absorbed in the sediment, where they undergo a process of interaction and degradation, resulting in a gamut of different responses, as observed in Sampler 2.

The various Sampler 2 responses found in the August 2008 and October 2008 samplings, indicate that the absence of rain caused hardness of soil thereby restricting the ability of the first rainfall water to move organic sediment to the stream. So, only the organic matter present in the most superficial layers was drained, evidencing its low concentration. However, the organic chemical analyses (Table 2) verified high concentrations of PHAs, thus explaining the high cytotoxic response despite the low extract concentrations analyzed and masking the mutagenic response.

Table 1 Mutagenic responses of organic extract liquid - liquid (revertants/L water equivalent) and organic extract of sediment (revertants/g dry sediment equivalent) and cytotoxicity (L or g dry sediment equivalent) in presence and absence of S9 mix, from superficial soil drainage in Winter (W) and Spring (S) of 2008.

Area/Sampling		TA98		TA97a		TA100		^a Cytotoxicity		
		-S9 mix	S9 mix	-S9 mix	S9 mix	-S9 mix	S9 mix	-S9 mix	S9 mix	
08/2008	W	Sampler 1								
		liq - liq extract	717±315.98 ^b	ns ^c	2,184± 899.60	ns	1,149± 594.53	ns	-	-
		Sampler 2								
		liq - liq extract	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-	0.01
10/2008	S	Sampler 1								
		liq - liq extract	439± 209.36	ns	ns	ns	ns	ns	-	0.02
		Sampler 2								
		liq - liq extract	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-	-
10/2008	W	Sampler 2								
		organic extract	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-	0.04
10/2008	S	Sampler 2								
		organic extract	ns	21±4.00 ^d	ns	102±26.00	ns	ns	0,61	0.61

Negative control (rev/plate ± standard deviation) (5 µL DMSO/plate) -S9 mix: 31.5 ± 4.95 (TA98), 210.3 ± 14.22 (TA97a), 257.0 ± 4.36 (TA100); +S9 mix: 37.0 ± 2.65 (TA98), 229.3 ± 8.08 (TA97a), 235.7 ± 13.58 (TA100); Positive control - S9 mix: 4NQO (0.5µg/plate) 357.0 ± 52.32 (TA98), 700.5 ± 10.6 (TA97a) and AZS (5µg/plate) 1022.5 ± 133.60 (TA100); +S9 mix: 2AF (10µg/plate) 338.0 ± 50.91 (TA98), 511.0 ± 8.48 (TA97a) and 1051.0 ± 76.3 (TA100). ^a first dosage Cytotoxic, - non cytotoxic samples - in the presence of at least one dosage, cell survival is less than 60% of negative control; ^b Number of revertants/L superficial soil drainage (liquid part); ^c ns, non significant response; ^d revertants/g dry sediment equivalent; ns, non significant response..

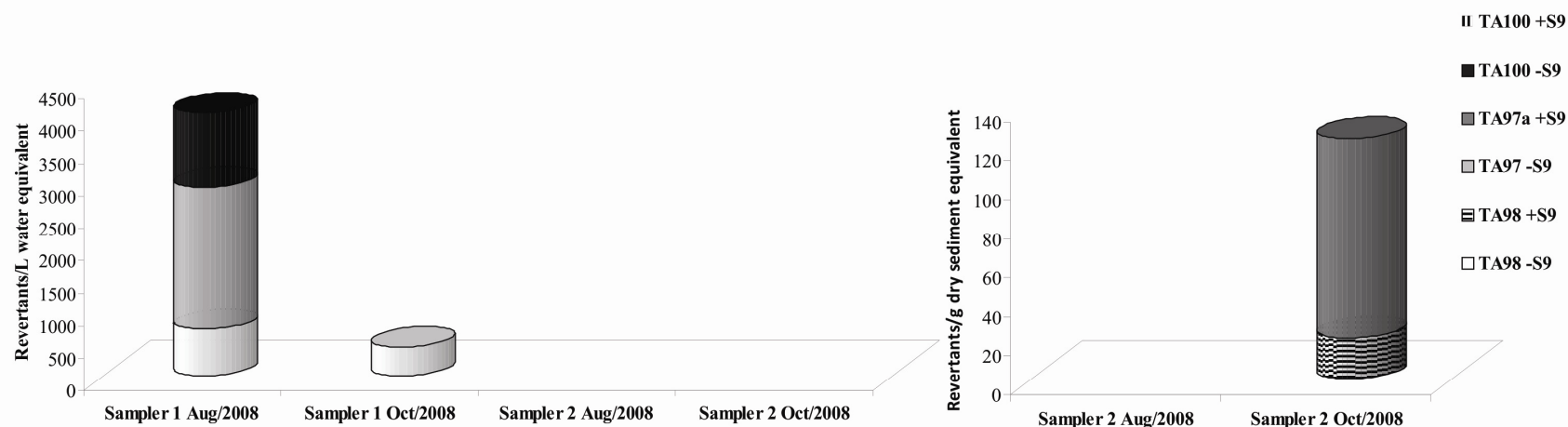
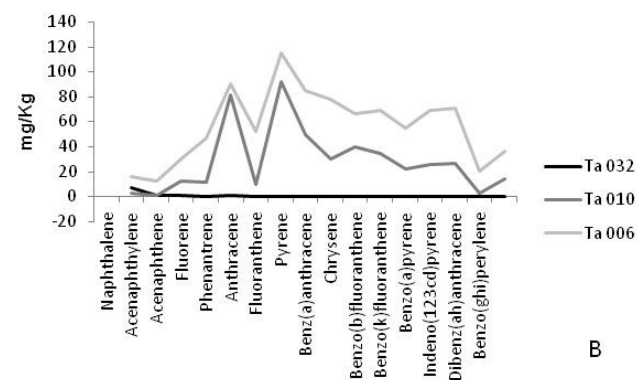
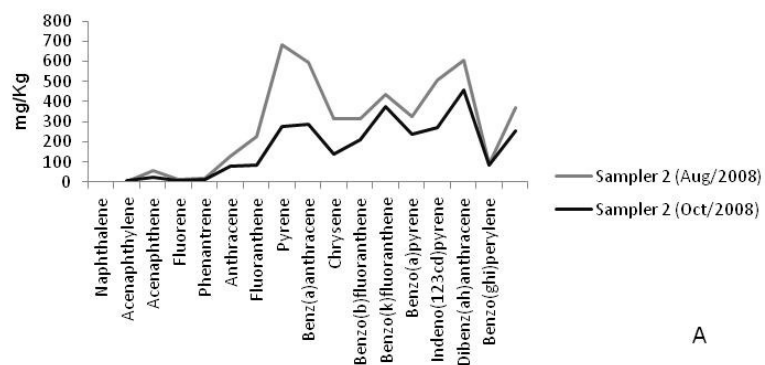


Figure 5 Mutagenic potency of water (revertants/L of superficial soil drainage and sediment (revertants/g of dry sediment equivalent) from superficial soil drainage to total sum of the strains that detect frameshift (TA98 and TA97A) and base-pair substitution (TA100) mutagens in the absence and presence of metabolic activation in site and sampling carried out.

Table 2 Organic chemical analyses for PHAs in mg/Kg of sediment drained for out off the contaminated soil site in August/2008 and October/2008 sampling (A) and a characterization of Taquari sediment (B).

	Sampler 2 (Aug/2008)	Sampler 2 (Oct/2008)	Ta 032	Ta 010	Ta 006
Naphthalene	3,12	6,49	7,37	3,18	15,83
Acenaphthylene	55,38	22,80	0,66	1,21	12,38
Acenaphthene	14,58	5,22	0,75	12,31	29,98
Fluorene	17,47	10,17	0,01	11,70	46,59
Phenantrene	129,32	75,88	0,65	81,06	89,69
Anthracene	228,80	81,34	0,01	9,90	51,63
Fluoranthene	681,27	276,97	0,46	91,54	114,62
Pyrene	594,83	289,57	0,45	49,61	84,43
Benz(a)anthracene	314,77	136,02	0,08	30,37	77,46
Chrysene	315,87	207,65	0,00	39,42	66,57
Benzo(b)fluoranthene	433,25	374,71	0,33	34,21	68,92
Benzo(k)fluoranthene	327,55	235,72	0,01	22,00	54,67
Benzo(a)pyrene	507,85	269,23	0,00	25,94	68,43
Indeno(123cd)pyrene	604,53	458,15	0,00	26,80	70,49
Dibenz(ah)anthracene	93,12	79,89	0,20	2,79	20,27
Benzo(ghi)perylene	369,74	253,01	0,07	14,25	36,56
SOMA	4,691,45	2,782,84	11,02	456,29	908,52



3.3.2 Taquari river sediment

Given the concern about the possible contaminated soil site, the mutagenic activity investigation of Taquari sediment was essential. The evaluation of organic extract, interstitial water and gross sediment from different sites within the Taquari River basin, was performed in two seasons. Organic extract was investigated only by the *Salmonella* microsuspension test using the TA98, TA97a and TA100 strains, in the presence and absence of metabolic activation. Interstitial water was investigated by the *Salmonella* microsuspension test using the same samples and conditions and by the *Allium cepa* bioassay. The gross sediment was available only for the *Allium* test.

Table 3 summarizes the mutagenic activity results from the *Salmonella* test of organic extract (number of Revertants/g sediment equivalent) and interstitial water (number of Revertants/ml interstitial water equivalent). In organic sediment extract the results of sample Ta 032 presented mutagenic activity by frameshift mutation (TA98) without S9 mix in the September sampling. In Ta 010 the mutagenicity was significant at both samplings with presence of S9 mix. The respective mutation categories were frameshift (TA98 and TA97a) detected in December and both frameshift and base-pair substitution (TA100) in the September sampling. The Ta 006 site was proven to be mutagenic in the presence of metabolic activation, in both samplings, in which frameshift mutation (TA98) was identified. Cytotoxicity was verified in Ta 010 and Ta 006 at the higher dosage, and did not influence the mutagenicity analysis.

Fig. 6 summarizes the analysis of mutagenic potency by the Ames test for organic sediment extract by summing the three strains tested. The purpose of using different strains in the Ames test is to assess different groups of compounds that cause DNA damage. Data from the Ta 010 site revealed mutagens of different classes than the others, indicating

contamination by a distinct organic origin, probably by the chemicals employed in the nearby wood plant.

It should be noted that the TA98 strain indicated some mutagenicity in all samples: the chemical analyzes of PHAs (Table 2) show that the site Ta 006 was more contaminated than Ta 010 and the mutagenic potency found by TA98 +S9 in Ta 006 was also higher than Ta 010 in both samplings. This situation demonstrates that TA98 + S9 is a possible strain to identify these PHAs compounds, while a prior study [35] reports that, the TA98 strain is very sensitive to PHAs. Another point to be considered is the possibility that at the Ta 006 site contamination may have been due to different sources than in this study, thus raising the PHA levels. It is also important to consider that granulometry indicated the presence of fine particles in Ta 010 and Ta 006. Many aquatic pollutants are predominantly associated with fine deposits that are rich in organic matter. The environmental destination, the bioavailability and toxicity of these pollutants, particularly of semi-volatile organic substances, are determined by the interaction of these deposits [8]. Thus, fine particles from the Ta 010 site can be deposited at Ta 006. The upstream site (Ta 032) also has a different source of contamination that appears not to be present in significant amounts at the downstream sites, since at that time TA98 –S9 was capable of detecting the pollutant.

It is important to emphasize that the presence of CCA residues at the contaminated site can generate a release of heavy metals like chromium, copper and arsenic in toward the main river. It was previously reported [36] that these metals tend to concentrate in particles of silt - clay size that form a fraction transported almost entirely by suspension. The transfer of toxic metals from contaminated sediments to the water column occurs via interstitial waters. This flux of metals out of the sediment is responsible for the high metal levels measured in other environments even after the anthropogenic sources have been eliminated [36]

To diagnose the presence of mutagenic activity in the Taquari River, its interstitial water from sediment was evaluated initially by the Ames assay. The test yielded predominantly negative responses in both the December and September samplings. Only Ta 006 from the December sampling showed positive response for frameshift mutation (TA98) without metabolic activation (S9 mix). Cytotoxicity was found in the December samples Ta 010 and Ta 006 without metabolic activation at the higher dosage.

The analysis using the *Allium cepa* bioassay (Fig. 7) shows the data of indexes for interstitial water samples in December 2007 and September 2008. Samples Ta 032 and Ta 010 in the September sampling presented statistically significant for mitotic index (Fig. 7 – A), indicating cytotoxicity. Fig. 7 – B and C illustrate the mutagenic and chromosome aberration index, where samples Ta 032 and Ta 010 in December sampling yielded statistically positive responses for mutagenic and genotoxic activities. No toxic response (germination index) was observed (Fig. 7 – D). Treatment via direct sediment exposure produced no positive response for these indices. F1 cells did not show micronuclei, signifying a lack of mutagenicity.

The interstitial water investigation, as the data show, obtained divergent results from the *Salmonella*/microsuspension and *Allium cepa* tests. Therefore, the following conclusions can be draw: (1) It is possible identify different compounds in the applied assays showing the differential sensitivity. (2) The Ames test presents low sensitivity for detection of genotoxic effects caused by heavy metals, raising the question about its presence [37,38]. According to one study [38], some reasons for the lower sensitivity could be the filtration step (0.2 μm) used for eliminating the contaminant fraction potentially present in the sample, and the possibility that some of the components could attach to the filters and are consequently lost

for further testing. Although the filters used in the Ames test were submitted to watery extract and also DMSO solvent, no mutagenicity was detected in composites adhering to the filter. (3) The river can receive contaminants from the others sources inputting at different sites, which can be detected by both assays at the Ta 032 site located upstream from the source analyzed, a response also observed in a prior study [39] that also compared results from the Ames and *Allium cepa* bioassay in assessment of sludge.

Since soil and sediment comprise the growths medium for most plants, it seemed logical to perform an *Allium cepa* assay in direct sediment exposure. According to a prior study [6], although mutagenic potency can be detected in non-concentrated samples in many cases, each contaminant is usually present at such low levels that it is difficult to detect, which constitutes a possible explanation for the absence of positive response in direct sediment exposure assessment.

Finally, it can be concluded that the contaminated soil site in study could exported to the main river aggressive composites to the genetic material that underwent transformations from the origin (soil) through pluvial erosion and probably accumulated in fine particles of sediment. Relating the data to the compounds used in the wood conservation, beyond the PHAs analyzed chemically that probably originated from creosote or other anthropogenic sources, the presence of other organic substances could be also expected in the investigated sediment including dioxins and furans, resulting from the presence of pentachlorophenol, and heavy metals derived from CCA. Although contamination with pentachlorophenol and Cr, AS and Cu is limited to the contaminated area, there is a risk of runoff into the river. The biological assays, especially the *Salmonella*/microsome assay, enabled the detection of a

range of effects, with the sediment of the site Ta 010 being identified as main repository of these contaminants.

Table 3 Mutagenic response of sediment organic extract (revertants/g dry sediment equivalent) and interstitial water (revertants/mL) and cytotoxicity in presence and absence of S9 mix, from Taquari river basin in two samplings in Summer (S) and winter (W).

	Area/Sampling	TA98		TA97a		TA100		^a Cytotoxicity		
		-S9 mix	S9 mix	-S9 mix	S9 mix	-S9 mix	S9 mix	-S9 mix	S9 mix	
12/2007	S	Org. Extract Ta032	ns ^b	ns	ns	ns	ns	ns	-	-
		Org. Extract Ta010	ns	8±3.54	ns	46±7.79	ns	ns	1.22	0.61
		Org. Extract Ta006	ns	247±45.28	ns	ns	ns	ns	0.72	0.36
09/2008	W	Org. Extract Ta032	64±25.60	ns	ns	ns	ns	ns	-	-
		Org. Extract Ta010	ns	14±5.82	ns	92±7.62	ns	73±24.47	-	-
		Org. Extract Ta006	ns	42±9.26	ns	ns	ns	ns	0.52	0.13
12/2007	S	Int. water Ta032	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-	-
		Int. water Ta010	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.1	-
		Int. water Ta006	34±14.25	ns	ns	ns	ns	ns	-	-
09/2008	W	Int. water Ta032	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-	-
		Int. water Ta010	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-	-
		Int. water Ta006	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-	-

Negative control (rev/plate ± standard deviation) (interstitial water, 100 µL deionized water/ plate) -S9 mix: 38.7± 9.02 (TA98), 225.0 ± 23.81 (TA97a), 214.3 ± 11.50 (TA100); +S9 mix: 33 ± 8.72 (TA98), 180.7 ± 27.10 (TA100), 194.0 ± 33.94 (TA97a); (organic extract, 5 µL DMSO/plate) -S9 mix: 28.3 ± 4.04 (TA98), 187.7 ± 10.12 (TA97a), 169.3 ± 19.76 (TA100); +S9 mix: 41.7 ± 9.29 (TA98), 231.3 ± 13.43 (TA97a), 235.7 ± 17.39 (TA100); Positive control - S9 mix: 4NQO (0.5µg/plate) 410.5 ± 99.70 (TA98), 933.0 ± 169.7 (TA97a) and AZS (5µg/plate) 984.5 ± 17.67(TA100); +S9 mix: 2AF (10µg/plate) 575.0 ± 19.79 (TA98), 940.5 ± 34.64 (TA97a) and 1015.5 ± 35.30 (TA100). ^a first dosage Cytotoxic, - non cytotoxic samples - in the presence of at least one dosage cell survival is less than 60% of negative control; ^b ns, non significant .

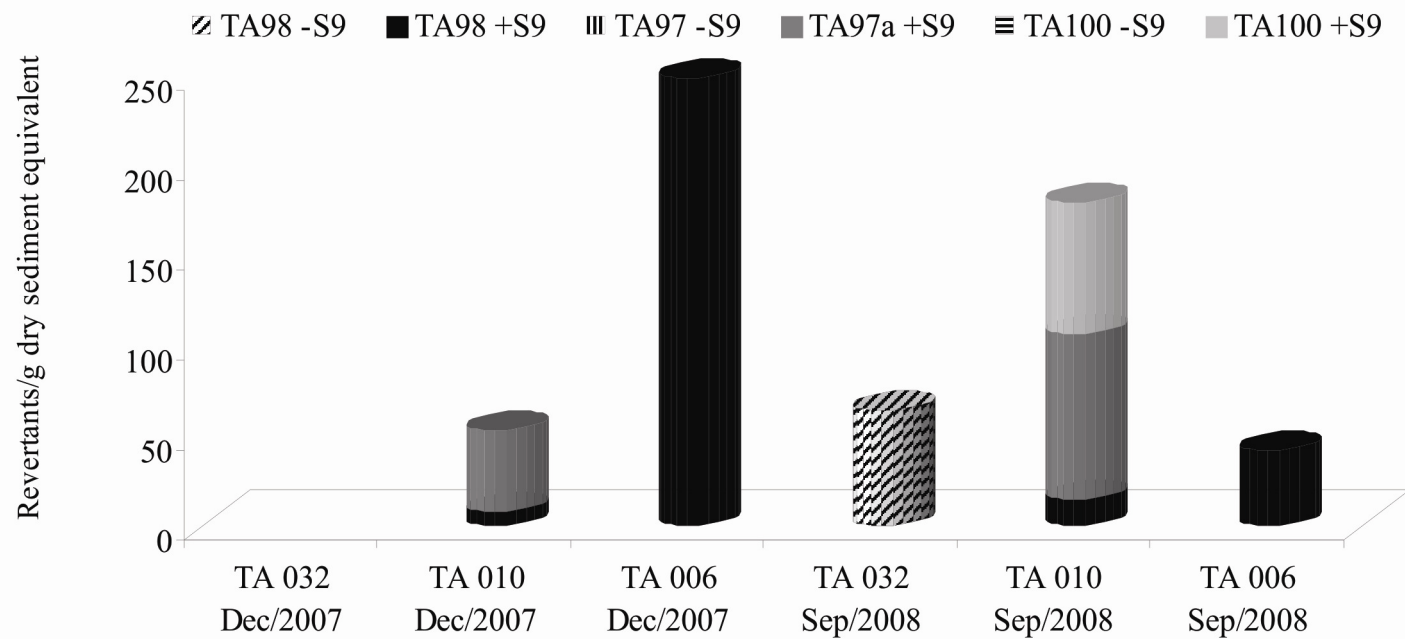
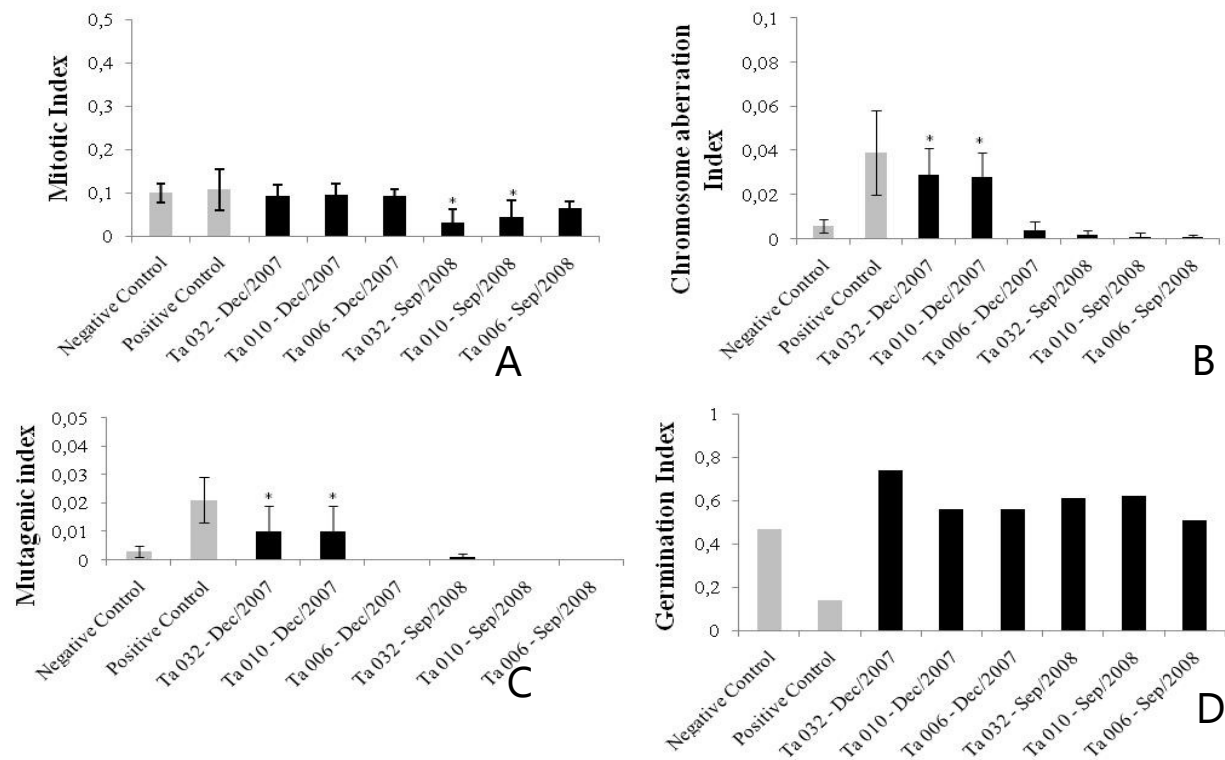


Fig. 6. Mutagenic potency in revertants per gram of dry sediment equivalent to total sum of the strains that detect frameshift (TA98 and TA97A) and base-pair substitution (TA100) mutagens in the absence and presence of metabolic activation in site and sampling carried out.



5000 cells analyzed per treatment. Mean ± S. D.

* Significantly different from negative control ($p < 0.05$), according to Kruskal – Walis test.

Positive control: treated seeds with 4×10^{-4} M of methyl methanesulfonate (MMS, Sigma – Aldrich, CAS 66-27-3).

Results of mitotic index (MI - A), chromosome aberration index (CA - B), mutagenic index (Mut I - C) and germination index (GI - D) of interstitial water from Taquari river basin in December/2007 and September/2008.

Fig. 7. Results of mitotic index (MI - A), chromosome aberration index (CA - B), mutagenic index (Mut I - C) and germination index (GI - D) of treated with interstitial water from Taquari river basin in December 2007 and September 2008.

3.4 Acknowledgements

The authors thank, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for the Master scholarship (T.C. Costa) and the project support. We are grateful to Maria Lúcia Kolowski Rodrigues for her support with the heavy metals chemical analysis and also to Jean Paolo Gomes Minella for the geological data. The research it is integrant part of the project Ecotoxicology strategies to characterize contaminated areas as measured of risk to the population health supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq.

3.5 References

- [1] O. Adam, P.M. Badot, F. Degiorgi, G. Crini, Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammaruspulex* (L.), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (2009) 441 – 449.
- [2] Brazil, Ibama, Produtos preservativos de madeira, Available in: <<http://www.ibama.gov.br>>, Access in: 15 dec. 2009.
- [3] J.S.L. Appel, V. Terescova, V.C.B. Rodrigues, V.M.F.Vargas, Aspectos toxicológicos do preservativo de madeira CCA (arseniato de cobre cromato): revisão, *Rev. Bras.Toxicol.* 19 (2007) 29 – 43.
- [4] J.A. Hingston, C.D. Collins, R.J. Murphy, J.N. Lester, Leaching of chromate copper arsenate wood preservatives: a review, *Environ. Pollut.* 111 (2001) 53 – 66.
- [5] V.M.F. Vargas, V.E.P. Motta, J.A.P. Henriques, Mutagenic activity detected by Ames test in river water under the influence of petrochemical industries, *Mutat. Res.* 319 (1993) 31-45.
- [6] T. Ohe, T. Watanabe, K. Wakabayashi, Mutagens in surface waters: a review, *Mutat.Res.* 567 (2004) 109-149.

- [7] V.M.F. Vargas, S.B. Migliavacca, R.C. Horn, N.R. Horn, Comparative temporal ecotoxicological study in a river basin influenced by petrochemical industries, *Sci. Total. Environ.* 392 (2008) 79-92.
- [8] G. Chen, P.A. White, The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review, *Mutat. Res.* 567 (2004) 151-225.
- [9] K.L. Dearfield, M.C. Cimino, N.E. McCarroll, I. Mauer, L.R. Valcovic, Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy, *Mutat. Res.* 521 (2002) 121-135.
- [10] P.A. White, L.D. Claxton, Mutagens in contaminated soil: a review, *Mutat. Res.* 567 (2004) 227-345.
- [11] Brazil, CETESB, Relação de áreas contaminadas-Novembro de 2008, Available in: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>, Access in: 4 apr. 2010.
- [12] Brazil, CONAMA, Portaria CONAMA nº 420 de 28 de dezembro de 2009, Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas, Available in: <http://www.mma.gov.br/conama>, Access in: 02 mar. 2010.
- [13] J. Cazenave, C. Bacchetta, M.J. Parma, P.A. Scarabotti, D.A. Wunderlin, Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina), *Environ. Pollut.* 157 (2009) 1-9.
- [14] K. Mortelmans, E. Zeiger, The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, *Mutat. Res.* 455 (2000) 29-60.
- [15] K.C. Tagliari, R. Cecchini, J.A.V. Rocha, V.M.F. Vargas, Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries, *Mutat. Res.* 561 (2004) 101-117.
- [16] R. Horn, V.M.F. Vargas, Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the *salmonella*/microsome assay, *Toxicol. in vitro* 22 (2008) 1143-1149.

- [17] A. Ducatti, V.M.F. Vargas, Mutagenic activity of airborne particulate matter as an indicative measure of atmospheric pollution, *Mutat. Res.* 540 (2003) 67-77.
- [18] D.M. Leme, M.A. Marin-Morales, *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its applications, *Mutat. Res.* 682 (2009) 71-81.
- [19] T.C.C. Fernandes, D.E.C. Mazzeo, M.A. Marin-Morales, Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide, *Pestic. Biochem. and Physiol.* 88 (2007) 252-259.
- [20] Brazil, FEPAM, Qualidade das águas da bacia hidrográfica do rio das Antas e do rio Taquari, Available in: <http://www.fepam.rs.gov.br>, Access in: 4 apr. 2010.
- [21] Brazil, CONAMA, Portaria CONAMA n° 396 de 03 de abril de 2008, Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências, Available in: <http://www.mma.gov.br/conama>, Access in: 02 mar. 2010.
- [22] Brazil, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Portaria n° 329/1985, Available in: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>, Access in: 12 mar. 2010.
- [23] D. F. B. de Lima, C. Rempel, R. R. Eckhardt, Análise ambiental da bacia hidrográfica do Rio Taquari – Proposta de zoneamento ambiental, *Rev. Geo. da Universidade Estadual de Londrina*, 16 (2007) 51-78.
- [24] V.M.F. Vargas, S.B. Migliavacca, A.C. de Melo, R.C. Horn, R.R. Guidobono, I.C.F.S. Ferreira, M.H.D. Pestana, Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants, *Mutat. Res.* 490 (2001) 141-158.
- [25] V.M.F. Vargas, Avaliação de testes para triagem e diagnóstico de agentes genotóxicos ambientais [Evaluation of test for diagnostic screening of environmental genotoxic agents], Doctoral Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 1992.
- [26] M.A.H Frason, Standard method for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, Washington, 19 ed. (1995).

- [27] D.E. Levin, E. Yamasaki, B.N. Ames, A new *Salmonella* tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens, *Mut. Res.* 94 (1982) 315-330.
- [28] N.Y. Kado, D. Langley, E. Eisenstadt, A simple modification of the *Salmonella* liquid-incubation assay, Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine, *Mut. Res.* 121 (1983) 25-32.
- [29] F.M.R. Da Silva Júnior, V.M.F. Vargas, Using the *Salmonella* assay to delineate the dispersion routes of mutagenic compounds from coal wastes in contaminated soil, *Mut. Res.* 673 (2009) 116 – 123.
- [30] B.N. Ames; W.E. Durston; E. Yamasaki, F.D. Lee, Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, *Proc. Nat. Acad. Scien.* 70 (1973) 2281-2285.
- [31] S. T. Matsumoto, M.S. Mantovani, M.I.A. Malagutti, A.L. Dias, I.C. Fonseca, M.A. Marin- Morales, Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips, *Genet. Mol.* 29 (2006) 148-158.
- [32] R. Caritá, M.A. Marin-Morales, Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes, *Chemosphere* 72 (2008) 722-725.
- [33] ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), Resumen de Salud Pública – Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Available in: <http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es phs69.pdf> Access in: 21 oct 2008.
- [34] USEPA, Method 3550C, Available in: <<http://www.epa.gov>> Access in: 7 jan. 2008.
- [35] M.V. Coronas, R.C. Horn, A. Ducatti, J.A.V. Rocha, V.M.F. Vargas, Mutagenic activity of airborne particulate matter in a petrochemical industrial area. *Mut. Res.* 650 (2008) 196-201.

- [36] A. Tovar- Sanchez, M.A. Huerta-Diaz, J.J. Negro, M.A. Bravo, S.A. Sañudo-Wilhelmy, Metal contamination in interstitial waters of Doñama Park, *J. Environ. Manag.* 78 (2006) 286-293.
- [37] S. Monarca, D. Feretti, I. Zerbini, A. Alberti, C. Zani, S. Resola, U. Gelatti, G. Nardi, Soil contamination detected using bacterial and plant mutagenicity tests and chemical analyses, *Environ. Res.* 88 (2002) 64-69.
- [38] B. Lah, T. Vidic, E. Glasencnick, T. Cepeljnik, G. Gorjank, R. Marinsek – Logar, Genotoxicity evaluation of water soil leachates by Ames test, comet assay, and preliminary *Tradescantia* micronucleus assay, *Environ. Monit. Assess.* 139 (2008) 107 – 118.
- [39] J. Rank, M.H. Nielsen, Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay, *Mutat. Res.* 418 (1998) 113-119.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação é resultado do trabalho desenvolvido durante o mestrado do Programa de Pós Graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em parceria com a Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roesler (FEPAM).

O tema foi embasado em um processo da FEPAM para avaliação de sítio com contaminação de solo por preservantes de madeira, com passivo ambiental identificado e localizado as margens do rio Taquari. Neste sítio as fontes de contaminação ainda são ativas e além da contaminação do solo, a água subterrânea em alguns pontos também foi impactada. Tendo em vista a proximidade de importante rio do Estado, das atividades agrícolas, pecuária, estabelecimentos residenciais e comerciais a possibilidade de risco ao ecossistema e a saúde humana é expressiva. O trabalho foi desenvolvido com a finalidade de diagnosticar uma das possíveis rotas dos poluentes deste sítio para o rio principal e avaliar se o sedimento deste rio está sendo depositário desses contaminantes com ação mutagênica, através de bioensaios *Salmonella/microsoma* e *Allium cepa*.

Empregando os ensaios como parâmetros precoces no diagnóstico da qualidade ambiental, juntamente com dados de meteorologia, geologia e análise de compostos orgânicos, verificou-se que após eventos significativos de chuva, o solo é drenado movimentando-se em direção aos corpos d'água associados ao rio Taquari. HPAs de natureza mutagênica conhecida, principalmente os semi-voláteis foram detectados neste material drenado, através de análises químicas, que indicaram elevados níveis para a maioria dos compostos avaliados. O teste de *Salmonella* microsoma corroborou com estes dados, por detectar através de diferentes linhagens em presença e ausência de fração metabolizadora (S9 mix) a possível ação destes

compostos. Supõem-se ainda que tais HPAs são procedentes do creosoto, cuja composição em sua maioria contempla esses compostos.

Esses poluentes podem chegar até o rio no ponto em frente ao sítio, através desses corpos d'água, somando-se a possíveis contaminantes presentes no lençol freático, cujo fluxo drena a partir da área contaminada para o rio principal. Este mesmo bioensaio detectou atividade mutagênica no extrato orgânico do sedimento do rio analisado, em frente a essa área de estudo, em diferentes linhagens na presença de S9 mix, ocasionando lesões no DNA do tipo erro no quadro de leitura (TA98 e TA97a) e substituição dos pares de base (TA100). Os resultados do teste de *Allium cepa* na água intersticial desta localidade, também confirmaram atividade mutagênica procedente de origem orgânica e/ou inorgânica. As análises de HPAs deste sedimento se mostraram elevadas, a caracterização da presença destes compostos é semelhante ao do material drenado do solo, apesar deste mostrar maiores percentuais. Esses resultados indicam que poluentes de várias classes apresentam risco de atingirem o rio Taquari a partir do sítio contaminado.

A ação de compostos mutagênicos no extrato orgânico, do ponto a jusante do sítio, foi detectada em apenas uma linhagem (dano por erro no quadro de leitura) no teste de Ames, em presença de S9 mix. Este mesmo teste detectou ação de compostos mutagênicos na água intersticial, também por linhagem que causa dano por erro no quadro de leitura, entretanto na ausência de S9 mix, indicando poluentes de ação direta. Neste ponto foram observadas as maiores concentrações de HPAS do tipo semi – voláteis, sugerindo que estes compostos ou estão sendo transportados pelas partículas finas de sedimento nas quais se aderem a partir da região acima. Favorecendo esta conclusão, o sedimento em frente ao sítio contaminado é composto em sua maioria por partículas finas, assim como, em menor concentração, também

esse ponto a jusante. Entretanto, não pode ser desconsiderada a hipótese de que outra fonte de contaminação possa estar impactando o local e influenciando neste índice de contaminantes orgânicos.

O local considerado de referência, a montante, apresentou no extrato orgânico, menor potencial mutagênico para apenas um tipo de dano observado no teste de Ames em condições de ausência de metabolização (compostos de ação direta) diferentes dos detectados nos demais locais. Na avaliação com *Allium cepa*, também foi possível verificar ação de compostos mutagênicos neste local. As análises químicas de HPAS nesse ponto de referência mostram níveis baixos em relação aos pontos à jusante, indicando uma menor contaminação. Essas análises também informaram maior presença de compostos voláteis como o naftaleno e acenaftileno do que semi – voláteis, os quais se perdem durante o processo de extração orgânica, portanto ocasionando baixa detecção através do teste de Ames. As características granulométricas desse sedimento indicam um maior percentual de partículas grossas, não favoráveis a aderência desses compostos, portanto seu acúmulo provavelmente não foi evidenciado ao longo do rio.

Através dos ensaios de genotoxicidade, em especial o teste de *Salmonella* microsoma, foi possível caracterizar o potencial genotóxico da drenagem superficial de solo proveniente do sítio contaminado, bem como do extrato orgânico e água intersticial do sedimento do rio em estudo. A partir dos resultados geológicos, químicos e biológicos, pode – se concluir que a área impactada possivelmente está sofrendo processo de drenagem em direção ao riacho analisado (área interna do sítio contaminado) e este oferece um risco de transporte de sedimentos e água, juntamente com os agentes mutagênicos, ao rio principal. Embora não tenham sido verificadas concentrações elevadas de metais nas amostras, existe a presença

destes em decorrência do CCA. Portanto é recomendado que trabalhos futuros avaliem as formas biodisponíveis de metais nestas amostras.

Assim sendo, a presença de HPAs, o uso de pentaclorofenol e seus resíduos, ainda existentes no sítio, põe em risco de contaminação o sedimento do rio Taquari.

5 REFERÊNCIAS

ADAM, O.; BADOT, P.M.; DEGIORGI, F. & CRINI, G. Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 441 – 449, 2009.

AMES, B.N.; DURSTON, W.E.; YAMASAKI, E. & LEE, F.D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.70, p. 2281-2285, 1973.

APPEL, J.S.L.; TERESCOVA, V.; RODRIGUES, V.C.B. & VARGA, V.M.F. Aspectos toxicológicos do preservativo de madeira CCA (arseniato de cobre cromato): revisão. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 19, p. 29 – 43, 2007.

AHTIAINEN, J.; VALO, R.; JARVINEN, M. & JOUTTI, A. Microbial toxicity test and chemical analysis as monitoring parameters at composting of creosote-contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 323-329, 2002.

BARATA,C.; LEKUMBERRI, I.; VILA-ESCALÉ, M.; PRAT, N. & PORTE, C. Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from Llobregat river basin (NE Spain). **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 3-19, 2005.

BOLOGNESI, C.; RABBONI, R. & ROGGIERI, P. Genotoxicity biomarkers in *M. Galloprovincialis* as indicators of marine pollutants. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 113, p. 319-323, 1996.

CARDOZO, T.R.; ROSA, D.P.; FEIDEN, I.R.; ROCHA, J.A.V.; OLIVEIRA, N.C.D.; PEREIRA, T.S.; PARTORIZA, T.F.; MARQUES, D.M.; LEMOS, C.T.; TERRA, N.R. & VARGAS, V.M.F. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. **Mutation Research**, v. 603, p. 83-86, 2006.

CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; PARMA, M.J.; SCARABOTTI, P.A. & WUNDERLIN, D.A. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). **Environmental Pollution**, v. 157, p. 1-9, 2009.

CONSELHO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução CONSEMA n° 129/2006**. Disponível em: <<http://www.sema.rs.gov.br>>. Acesso em: 03 mar. 2010.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução CONAMA n° 357 de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama>>. Acesso em: 02 mar. 2010.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Portaria CONAMA n° 396 de 03 de abril de 2008**. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama>>. Acesso em: 02 mar. 2010.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Portaria CONAMA n° 420 de 28 de dezembro de 2009**. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama>>. Acesso em: 02 mar. 2010.

CHEN, G. & WHITE, P.A. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. **Mutation Research**, v.567, p.151-225, 2004.

CORONAS, M.V.; HORN, R.C.; DUCATTI, A.; ROCHA, J.A.V & VARGAS, V.M.F. Mutagenic activity of airborne particulate matter in a petrochemical industrial area. **Mutation Research**, v. 650, p. 196-201, 2008.

DA SILVA JÚNIOR, F.M.R. & VARGAS, V.M.F. Using the *Salmonella* assay to delineate the dispersion routes of mutagenic compounds from coal wastes in contaminated soil. **Mutation Research**, v. 673, p.116 – 123, 2009.

EISELE, M.; STEINBRICH, A.; HILDEBRAND, A. & LEIBUNDGUT, C. The significance of hydrological criteria for the assessment of the ecological quality in river basins. **Physics and Chemistry of the Earth**, v. 28, p. 529-536, 2003.

ENGWALL, M.A.; PIGNATELLO, J. J.; & GRASSO, D. Degradation and detoxication of the wood preservatives creosote and pentachlorophenol in water by the photofenton reaction. **Water Research**, v. 33, p. 1151-1158, 1998.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C. & MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252-259, 2007.

FERNANDEZ, M.L.; GAUTHIER, L. & ZOLL-MOREUX, C. Amphibian micronucleus tests: a simple and reliable method for evaluating in vivo genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations. **Mutation Research**, v. 292, p. 83-99, 1993.

FISKESJO, G. The Allium test as standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

FISKESJO, G. The Allium test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**, v. 197, p. 243-260, 1988.

FRENZILLI,G.; NIGRO M. & LYONS, B.P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, v. 681, p. 80-92, 2009.

GISBERT, C.; CLEMENTE, R.; NAVARRO-AVIÑO, J.; BAIXAULI, C.; GINÉR, A.; SERRANO, R.; WALKER, D.J. & BERNAL, M.P. Tolerance and accumulation of heavy metals by Brassicaceae species grown in contaminated soils from Mediterranean regions of Spain. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p. 19-27, 2006.

GRANT, W.F. The presence status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, p. 175-185, 1994.

HARTNIK, T.; NORLI, H.N.; EGGEN, T. & BREEDVELD, G.D. Bioassay-directed identification of toxic organic compounds in creosote-contaminated groundwater. **Chemosphere**, v. 66, p. 435-443, 2007.

HINGSTON, J.A.; COLLINS, C.D.; MURPHY, R.J. & LESTER, J.N. Leaching of chromate copper arsenate wood preservatives: a review. **Environmental Pollution**, v.111, p. 53 – 66, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Produtos preservativos de madeira. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/qualidadeambiental/madeira/index.php>> Acesso em: 15 dez. 2009.

JHA, A.N. Genotoxicological studies in aquatic organism: an overview. **Mutation Research**, v. 552, p. 1-17, 2004.

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, p. 25-32, 1983.

KJELLOW, A. & HENRIKSEN, O. Supercritical wood impregnation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 50, p. 297-304, 2009.

LAH, B.; VIDIC, T.; GLASENCNICK, E.; CEPELJNIK, T.; GORJANC, G. & MARINSEK – LOGAR, R. Genotoxicity evaluation of water soil leachates by Ames test, comet assay, and preliminary *Tradescantia* micronucleus assay. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 139, p. 107 – 118, 2008.

LEME, D.M. & MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water- A case study. **Mutation Research**, v. 650, p. 80-86, 2008.

LEME, D.M. & MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* Test in environmental monitoring: a review on its applications. **Mutation Research**, v. 682, p. 71-81, 2009.

MA, T.H.; XU, Z.; XU, C.; McCONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A. & ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185-195, 1995.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Portaria n° 329/1985**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 12 fev. 2010.

MINISTÉRIO DA ECONOMIA. Decreto-Lei n° 264/1998. Disponível em: <http://www.primemineconomia.pt/PresentationLayer/ResourcesUser/docs/d22534.pdf>. Acesso em: 3 fev.2010.

MONARCA, S.; FERETTI, D.; ZERBINI, I.; ALBERTI, A.; ZANI, C.; RESOLA, S., GELATTI, U. & NARDI, G. Soil contamination detected using bacterial and plant mutagenicity tests and chemical analyses. **Environmental Research Section A**, v. 88, p.64-69, 2002.

MORTELMANS, K. & ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v.455, p.29-60, 2000.

OHE, T.; WATANABE, T. & WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**, v.567, p. 109-149, 2004.

OOST, R. V. D; BEYER, J. & VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

PAES, J.B.; MELO, R.R.; LIMA, C.R. & GUEDES, R. S. Eficiência do tratamento preservativo na resistência da madeira de leucema (*Leucaena leucocephala*) a organismos xilófagos. **Revista Forestal Venezuelana**, v. 52, p. 85-91, 2008.

PERELO, L.W. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, p. 81–89, 2010.

PEREIRA, T.S.; ROCHA, J.A.V.; 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**, v. 629, p. 71-80, 2007.

POLLACK, N.; CUNNINGHAM, A.R. & ROSENKRANZ, H.S. Environmental persistence of chemicals and their carcinogenic risks to humans. **Mutation Research**, v.528, p. 81-91, 2003.

RANK, J. & NIELSEN, M.H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v.18, p. 49-53, 1993.

RANK, J. & NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v.418, p. 113-119, 1998.

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**, v. 561, p. 101-117, 2004.

TEMIZ, A.; YILDIZ, U.C & NILSSON, T. Comparison of copper emission rates from wood treated with different preservatives to the environment. **Building and Environment**, v. 41, p. 910-914, 2006.

TOWNSEND, T.; TOLAYMAT, T.; SOLO-GABRIELE, H.; DUBEY, B.; STOOK, K. & WADANAMBI, L. Leaching of CCA- treated wood: implications for waste disposal. **Journal of Hazardous Materials B**, v. 114, p. 75-91, 2004.

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A; SANCHEZ, P.S. & SATO, M.I.Z. The *Salmonella* mutagenicity assay based on a 20-year survey. **Mutation Research**, v. 491, p. 119-126, 2001.

UMBUZEIRO, G.A.; KUMMROW F.; ROUBICEK, D.A. & TOMINAGA, M.Y. Evaluation of the water genotoxicity from Santos Estuary (Brazil) in relation to the sediment contamination and effluent discharges. **Environment International**, v. 32, p. 359-364, 2006.

VARGAS, V.M.F.; MOTTA, V.E.P. & HENRIQUES, J.A.P. Mutagenic activity detected by Ames test in river water under influence of petrochemical industries. **Mutation Research**, v. 319, p. 31-45, 1993.

VARGAS, V.M.F. Mutagenic activity as a parameter to assess ambient air quality for protection of the environment and human health. **Mutation Research**, v. 544, p. 313-319, 2003.

VARGAS, V.M.F.; MIGLIAVACCA, S.B.; HORN, R.C & TERRA, N.R. Comparative temporal ecotoxicological study in a river basin influenced by petrochemical industries. **Science of the Total Environment**, v. 392, p. 79-92, 2008).

VÁZQUEZ, S.; CARPENA, R.O. & BERNAL, M.P. Contribution of heavy metals and As-loaded lupin root mineralization to the availability of the pollutants in multi-contaminated soils. **Environmental Pollution**, v. 152, p. 373-379, 2008.

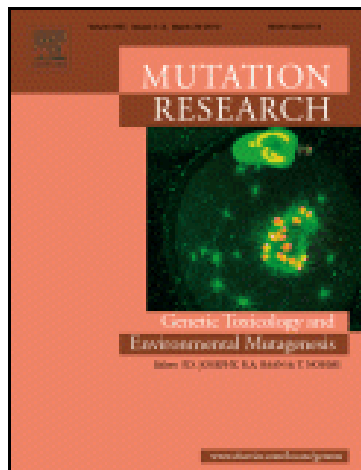
ZHU, B.Z.; SVETLANA SHECHTMAN, S. & CHEVION, M. Synergistic cytotoxicity between pentachlorophenol and copper in a bacterial model. **Chemosphere**, v. 45, p. 463-470, 2001.

YILDIZ, U.C.; TEMIZ, A.; GEZER, E.D. & YILDIZ S. Effects of the wood preservatives on mechanical properties of yellow pine (*Pinus sylvestris* L.) wood. **Building and Environment**, v. 39, p. 1071-1075, 2004.

WHITE, P.A.; CLAXTON, L.D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutation Research**, v.567, p.227–345, 2004.

ANEXO 1: Regras da Revista Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

(http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/522820/authorinstructions#25000)



Guide for Authors

A section of Mutation Research

Types of Paper

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis publishes the following types of article: (I) Research papers- papers reporting results of original, fundamental research. (II) Short communications of up to 5 printed pages. (III) Rapids - are accelerated publications - research papers identified by the Editor as being of significant quality and thereby qualifying for rapid reviewing, and publication within 8-10 weeks of acceptance. (IV) Current issues are generally short, 1-2 page comments on a topical theme, and are published within 10 weeks of acceptance. (V) Volunteered and invited Mini-reviews of less than 10 printed pages, using references generally no later than 2 years old. The journal accepts Letters to the Editor.

Please note that Full-length reviews comprehensively covering and critically analysing a topic are published in *Mutation Research Reviews*. Also published in the Reviews section are invited papers in the series *Reflections in Mutation Research*, in which research and techniques that have played an important part in the development of the field of mutation research are revisited and their significance discussed. Special issues, comprising multiple original and/or review articles written from a particular viewpoint, on a central theme, are published on a regular basis in the appropriate section of Mutation Research by topic or article type.

It is the policy of the Editors to conduct a preliminary review of each submitted manuscript that reports results of studies on extracts or complex mixtures. If such papers do not offer new data and insight on the chemical nature of the active components or their mechanisms of action, the manuscript will be returned to the authors without being sent for further review.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If

excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing

with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on.

Essential title page information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should be up to 300 words of size.

Keywords

Immediately after the abstract, provide between 3 to 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at

their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: "..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result"

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text. *Examples:* Reference to a journal publication: [1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun.163(2000)51–59.

Reference to a book: [2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, third ed., Macmillan, New York, 1979. Reference to a chapter in an edited book: [3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 1999, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;
List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;
CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the

corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.