

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Programa de Pós Graduação em Ecologia**

**DETERMINAÇÃO DA MUTAGENICIDADE E ATIVIDADE
CITOTÓXICA DE SEDIMENTOS EM ÁREA SUJEITA À
CONTAMINAÇÃO PETROQUÍMICA**

Dissertação de Mestrado

Rubem Cesar Horn

Porto Alegre, 2004

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

Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO DA MUTAGENICIDADE E ATIVIDADE
CITOTÓXICA DE SEDIMENTOS EM ÁREA SUJEITA À
CONTAMINAÇÃO PETROQUÍMICA**

RUBEM CESAR HORN

Porto Alegre, março de 2004

DETERMINAÇÃO DA MUTAGENICIDADE E ATIVIDADE CITOTÓXICA DE SEDIMENTOS EM ÁREA SUJEITA À CONTAMINAÇÃO PETROQUÍMICA

RUBEM CESAR HORN

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, área de concentração em Ecotoxicologia e Bioindicação.

Orientadora: Dra. Vera Maria Ferrão Vargas

Fundação Estadual de Proteção Ambiental
Henrique Luis Roessler (FEPAM)

Comissão examinadora:

Prof. Dr. Álvaro Augusto C. Leitão

Dra. Clarice Torres de Lemos

Prof. Dra. Maria Teresa Raya-Rodriguez

Porto Alegre, março de 2004

AGRADECIMENTOS

À Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler que, na medida de suas possibilidades financeiras e políticas, tenta gestionar conflitos entre a sociedade e o meio ambiente e, silenciosamente, atua procurando sempre a melhoria da qualidade ambiental.

Aos órgãos de fomento à pesquisa que sempre passam por dificuldades na busca de fontes de financiamento, que são constituídas quase que totalmente por verbas públicas. Cada vez mais deveriam somar-se a estas, verbas privadas, sob a tutela dos Órgãos Oficiais, uma vez que geralmente são as próprias empresas privadas que se beneficiam dos produtos gerados por este capital social.

A minha família e meus amigos por compreenderem os meus esforços para crescer cientificamente.

As professoras Maritza B. S. Gozalvo e Heidy Hofmann pelo seus auxílios na correção do português e versão para o inglês da dissertação.

Principalmente à minha colega, amiga e orientadora Vera Maria Ferrão Vargas que, ao longo de toda minha vida acadêmica e profissional, apoiou minhas idéias e possibilitou meu crescimento científico e acadêmico.

Aos meus colegas da Divisão de Biologia e Setor de Amostragem da Fepam e meus colegas e professores do Curso de Pós-Graduação em Ecologia por criticarem, trocarem experiências de vida, sugerirem e interagirem pois, atualmente, cada vez mais a Ciência é feita pela interatividade e constante troca de experiências.

Obrigado a todos...

"De uma coisa sabemos: A terra não pertence ao homem; é o homem que pertence à terra, disso temos certeza. Todas as coisas estão interligadas, como o sangue que une uma família. Tudo está relacionado entre si. Tudo quanto agride a terra, agride os filhos da terra, não foi o homem quem teceu a trama da vida. Ele é meramente um fio da mesma. Tudo que ele fizer à terra, a si próprio fará."

Cacique Seattle, da Tribo Duwamisk, 1855.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
<i>1.1. Aplicabilidade do ensaio Salmonella/microsoma para avaliar mutagenicidade em estudos ambientais.....</i>	<i>3</i>
<i>1.2. Ensaio em sedimentos</i>	<i>5</i>
<i>1.3. Informações relevantes das principais fontes poluidoras.....</i>	<i>9</i>
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
<i>3.1. Pontos de amostragem</i>	<i>14</i>
<i>3.2. Coletas</i>	<i>16</i>
<i>3.3. Extração de compostos orgânicos</i>	<i>17</i>
<i>3.3.1. Extração úmida de sedimento.....</i>	<i>17</i>
<i>3.4. Análise de granulometria</i>	<i>18</i>
<i>3.5. Avaliação da mutagenicidade</i>	<i>19</i>
<i>3.5.1. Princípio do método.....</i>	<i>19</i>
<i>3.5.2. Checagem dos marcadores genéticos dos organismos bioindicadores</i>	<i>21</i>
<i>3.5.3. Ensaio de mutagenicidade.....</i>	<i>22</i>
<i>3.5.4. Ensaio de citotoxicidade.....</i>	<i>25</i>
<i>3.5.5. Avaliação dos resultados.....</i>	<i>25</i>
<i>3.5.5.1. Cálculo do índice de atividade mutagênica (IM).....</i>	<i>25</i>
<i>3.5.5.2. Cálculo do percentual de sobrevivência celular.....</i>	<i>26</i>
<i>3.5.5.3. Critérios de avaliação do ensaio</i>	<i>26</i>
<i>3.5.5.4. Expressão de resultados</i>	<i>27</i>
<i>3.6. Avaliação estatística</i>	<i>27</i>
<i>3.6.1. Avaliação estatística da curva dose-resposta do ensaio de microsuspenção</i>	<i>27</i>

4. ARTIGO: DETERMINATION OF SEDIMENT MUTAGENICITY AND CYTOTOXICITY IN AN AREA SUBJECT TO PETROCHEMICAL CONTAMINATION	29
4.1. INTRODUCTION.....	31
4.2. MATERIALS AND METHODS:	32
4.2.1. <i>Chemical substances</i>	32
4.2.2. <i>Study areas</i>	33
4.2.3. <i>Wet extraction of sediments</i>	34
4.2.4. <i>Grain size analysis</i>	34
4.2.5. <i>Mutagenic and cytotoxicity evaluation assay</i>	34
4.2.6. <i>Statistical analysis</i>	35
4.3. RESULTS	35
4.4. DISCUSSION	37
4.5. REFERENCES.....	41
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	59
ANEXOS.....	68

Lista de tabelas

Tabela 3.1: Linhagens bacterianas utilizadas no ensaio de mutagenicidade.	20
--	----

Lista de figuras

Figura 3.1: Mapa da área e seus pontos amostrais.	25
Figura 3.2: Ponto BJn	26
Figura 3.3: Ponto BJ002	26
Figura 3.4: Ponto BJ000	27
Figura 3.5: Aspersores de efluentes líquidos no solo.	28
Figura 3.6: Mapa de usos do solo da microbacia do arroio Bom Jardim.	30
Figura 3.7: Coletor em PVC utilizado nas coletas.	31
Figura 3.8: Diagrama de realização da extração úmida de sedimento.	32
Figura 3.9: Análise granulométrica de materiais finos.....	33
Figura 3.10: Diagramas do mecanismo de ação de mutações do tipo substituição de pares de bases (a) e deslocamento do quadro de leitura (b)	34
Figura 3.11: Esquema do método de ensaio de determinação de mutagenicidade.	38
Figure 4.1: Location of the sampling points.	59
Figure 4.2: Mutagenic evaluation by microsuspension assay with frameshift strains (TA98 and TA97a) in the absence of metabolic activation.	60
Figure 4.3: Mutagenic evaluation by microsuspension assay with frameshift strains (TA98 and TA97a) in the presence of metabolic activation.	61
Figure 4.4: Mutagenic evaluation by microsuspension assay with substitution base pair strains (TA100 and TA 1535) in the absence of metabolic activation	62
Figure 4.5: Mutagenic evaluation by microsuspension assay with substitution base pair strains (TA1000 and TA1535) in the presence of metabolic activation.....	63
Figure 4.6: Mutagenic activity according to the types of damages observed in the DNA.....	64
Figure 4.7: Mutagenic activity in different metabolic treatments.....	65

Figure 4.8: Mutagenic activity and its seasonal distribution	66
Figure 4.9: Results of cytotoxic activity (%) and its seasonal distribution.	67
Figure 4.10: Results of cytotoxic activity (%) at different sampling points.....	68
Figure 4.11: Results of grain size analysis.	69
Figure 4.12: Results of wet sediment extraction.	70

Siglas

CETESB/SP – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo

FDA – Food and Drug Administration.

FEPAM – Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler.

ICH – International Conference on Harmonization.

LE - Lagoas de estabilização.

OECD – Organization for Economic Co-operation and Development.

PAHs - Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

SICECORS - Sistema Centralizado de Controle de Resíduos Sólidos.

SITEL - Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes Líquidos.

UKEMS - United Kingdom Environmental Mutagen Society.

USEPA - United States Environmental Protection Agency.

RESUMO

O acúmulo de mutações, alterações incorporadas ao patrimônio genético de células somáticas e germinais, pode causar redução de populações naturais que são críticas para a cadeia alimentar, pondo em risco a sobrevivência de determinadas espécies. Embora o dano causado pela contaminação química ocorra em nível molecular, existem efeitos emergentes nas populações, tais como perda da diversidade genética, que não é previsível com base somente no conhecimento dos mecanismos de toxicidade não genéticos. Alguns compostos de origem antrópica tendem a adsorver no material orgânico do sedimento, sendo concentrados ao longo do tempo. Contaminantes ambientais podem ser mais associados com a porção fina dos sedimentos (silte ou argila) do que com a grosseira (areia ou cascalho). O presente estudo avaliou a atividade mutagênica e citotóxica de extratos moderadamente polares de sedimento em três pontos durante 5 coletas realizadas nos anos de 1999 e 2000 no arroio Bom Jardim, que drena a região do Complexo Petroquímico, localizado no município de Triunfo, Rio Grande do Sul. Foi utilizado na avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade o ensaio *Salmonella*/microssoma, método de microssuspensão. A análise de granulometria mostrou um conteúdo de partículas finas em média menor no ponto em frente ao complexo, sendo este também o ponto amostral com menor percentual de material orgânico extraído. Observou-se baixa atividade mutagênica nos diferentes locais estudados, variando de 3,3% até 8,3%, sendo a citototoxicidade o mais importante efeito biológico observado na região, variando de 20% até 40%, somados os resultados dos ensaios em presença e ausência de metabolização externa. Os pontos com maior contaminação estão localizados em frente e a jusante da área industrial, havendo uma distribuição gradativa e sazonal das respostas à medida que o local se aproxima da foz do arroio. Em ensaios com ausência de fração de metabolização hepática, as respostas

para mutagênese e citotoxicidade foram mais freqüentes, sendo os danos do tipo erro no quadro de leitura os mais presentes. A determinação da atividade mutagênica e citotóxica em amostras de sedimento mostrou-se importante na determinação da qualidade ambiental, apesar da composição química desta matriz ser bastante complexa. O ensaio *Salmonella*/microsoma monitorando danos moleculares e, principalmente citotoxicidade, foi uma ferramenta importante no diagnóstico da presença de poluentes. A possibilidade de avaliar danos precoces, através deste ensaio, promove a melhoria da qualidade ambiental e motiva ações de preservação do patrimônio genético da fauna e flora atingidas pela atividade antrópica.

ABSTRACT

The accumulation of mutations, alterations incorporated to the genetic heritage of somatic and germ cells, may cause the reduction of natural populations that are critical to the food chain, placing the survival of certain species at risk. Although the damage caused by chemical contamination occurs at a molecular level, there are effects emerging on a population level, such as loss of genetic diversity, which are not predictable based only on the knowledge of non-genetic toxicity mechanisms. Several anthropically-originated compounds tend to adsorb into the organic material of the sediment and to become concentrated over time. Environmental contaminants tend to be more closely associated with the fine portion of sediments (silt or clay) than with the gross one (sand or gravel). The present study evaluated the mutagenic and cytotoxic activity of moderately polar extracts of sediments at three points in 5 samplings in 1999 and 2000 in Bom Jardim Stream, which drains the region of the Petrochemical Complex, Triunfo – Rio Grande do Sul. For mutagenic and cytotoxicity analysis it's used the *Salmonella*/microsome microsuspension method assay. Grain size analysis showed a smaller amount of fine-particles on average in front of the complex, this also being the sampling point with the lowest percentage of extracted organic material. Low mutagenic activity was observed at the different sites studied, ranging from 3.3% to 8.3%, and the cytotoxic activity is the most significant in that area, ranging from 20% to 40%, adding up the results of the assays in the presence and absence of external metabolization. The points with highest contamination are located in front of and downstream from the industrial area, with a gradual and seasonal distribution of the responses as the site approaches the stream mouth. In assays performed in the absence of a hepatic metabolization fraction, the responses for mutagenesis and cytotoxicity were more frequent, frameshift error type damages being seen most often. Mutagenic and cytotoxic activity in sediment samples proved important to

determine environmental quality, despite the fact that the chemical composition of this matrix is very complex. The *Salmonella*/microsome assay monitoring molecular damage and especially cytotoxicity, was an important tool to diagnose the presence of pollutants. The possibility of evaluating early damages using this assay promotes the improvement of environmental quality and motivates actions to preserve the genetic heritage of fauna and flora affected by anthropic activity.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da industrialização e o desenvolvimento econômico conseqüentemente geram uma demanda maior na produção de efluentes nos processos produtivos. Estes rejeitos se constituem em preocupação tanto para o setor produtivo quanto para os órgãos responsáveis pela proteção ambiental, devido aos custos de seu tratamento e de sua disposição final no ambiente, pondo em risco os rios utilizados como depositários finais do lixo e efluentes gerados, industriais ou urbanos, que podem ser acumulados nos sedimentos.

O sedimento é uma parte integrante e componente dos ecossistemas aquáticos, servindo como *habitat* para muitos organismos. Apresenta-se também como um reservatório de poluentes e, portanto uma fonte potencial de contaminação da coluna d'água e organismos (USEPA, 2001). Alguns compostos de origem antrópica tendem a adsorver no material orgânico do sedimento, sendo concentrados ao longo do tempo.

Poluentes ou compostos químicos diversos lançados nos recursos hídricos formam uma mistura complexa de difícil diagnóstico tanto em nível químico quanto ecotoxicológico. Um grande número de trabalhos em diversas abordagens, estudando águas superficiais, intersticiais e sedimentos, têm constatado a contaminação destes recursos por misturas complexas de substâncias tóxicas e indutoras de dano genético (Loper, 1980; Meier, 1988; Valent, 1990; Houk, 1992; Stahl, 1991; Vargas, 1992, Claxton *et al.*, 1998; Vargas *et al.*, 1993; 2001a). Compostos deste tipo podem apresentar ampla distribuição no ambiente, sendo detectados também em amostras de ar e solo (Miguel *et al.*, 1990; Rosenkranz, 1996; DeMarini *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1995; Vargas *et al.*, 1998, 2003).

Vargas *et al.* (2001b) referem que o acúmulo de mutações, alterações incorporadas ao patrimônio genético de células somáticas e germinais, pode causar redução de populações naturais que são críticas para a cadeia alimentar, pondo em risco a sobrevivência de

determinadas espécies e afetar a riqueza e diversidade da fauna e flora local. Embora o dano causado pela contaminação química ocorra em nível molecular, existem efeitos emergentes populacionais, tais como alteração da diversidade genética, que não é previsível com base somente no conhecimento dos mecanismos de toxicidade não genéticos. Já a exposição humana a esses agentes genotóxicos através da ingestão, por via respiratória ou pelo contato cutâneo, pode promover conhecidos efeitos à saúde. É bem documentado que mutações têm um papel importante no processo de carcinogênese, potencialidade teratogênica e podem promover a elevação das taxas de várias doenças degenerativas (Connel, 1987; Vargas, 1992; Claxton, 1997; Bicckham *et al.*, 2000).

Amostras ambientais representam uma mistura complexa de substâncias orgânicas e inorgânicas que pode gerar compostos com propriedades genotóxicas. Os efeitos no genoma dependem da composição da mistura, da capacidade de biotransformação e das interações entre os diferentes compostos presentes na amostra e no material biológico.

A atividade genotóxica de substâncias puras ou misturas pode ser avaliada através de diferentes testes, tais como o ensaio *Salmonella*/microsoma em seus diversos métodos (pré-incubação, incorporação em placa e microssuspensão ou de Kado). Este teste já é utilizado por agências de controle ambiental do Brasil (FEPAM/RS – Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler do Rio Grande do Sul, CETESB/SP – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo) e normatizado internacionalmente por diversos países (USEPA - United States Environmental Protection Agency, 1985; Canadá, 1986; UKEMS - United Kingdom Environmental Mutagen Society, 1989, 1990 e 1992; FDA – Food and Drug Administration, 1993; ICH – International Conference on Harmonization, 1995; OECD – Organization for Economic Co-operation and Development, 1997).

1.1. Aplicabilidade do ensaio Salmonella/microsoma para avaliar mutagenicidade em estudos ambientais

O estudo da mutagenicidade de amostras ambientais utilizando o ensaio *Salmonella/microsoma* tem sido objeto de pesquisas com o desenvolvimento de programas colaborativos (Claxton *et al.*, 1987; 1991; 1995) buscando a seleção de metodologias que apresentem resultados comparáveis entre diversos laboratórios, em diferentes países. Este ensaio tem sido escolhido como metodologia básica para estudo de amostras ambientais devido ao seu amplo uso e contínuo aprimoramento.

Em revisão da literatura, Vargas (1992) destaca os estudos de avaliação mutagênica por teste de Ames (*Salmonella/microsoma*) em recursos hídricos, realizados no Brasil, nos estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo. Estes trabalhos revelam atividade mutagênica em água bruta, tratada e corpos de água receptores de efluentes industriais (Martins, *et al.*, 1982; Sanchez *et al.*, 1988 e Valent, 1990) no estado de São Paulo. No Rio Grande do Sul, em estudos na área de influência de Complexo Petroquímico, abrangendo efluentes industriais e amostras de água do rio Caí, os autores também verificaram a presença de atividade mutagênica (Vargas *et al.*, 1988; 1993; 1995). Ainda devem ser destacados os estudos da ação de metais pesados na atividade genotóxica em amostras de água e sedimento de recursos hídricos no Rio Grande do Sul (Vargas *et al.*, 2001a), bem como em diagnósticos relativos à contaminação do compartimento atmosférico (Vargas *et al.*, 1998; Ducatti *et al.*, 2001).

Os ensaios envolvendo microorganismos permitem associar fração de metabolização hepática de organismos superiores e analisar compostos que, metabolizados, podem ser biologicamente importantes, pela geração ou degradação de compostos prejudiciais. Uma das frações mais utilizadas é o homogenato de fígado de rato induzido pela substância Aroclor

1254 (mistura bifenil policlorinada-PCB), que permite o diagnóstico de metabólitos que possuem ação no DNA.

Entre os grupos de substâncias orgânicas de maior reatividade biológica para diferentes organismos estão os PAHs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), compostos classificados pela USEPA como mutagênicas e carcinogênicas através da geração de aductos no DNA (Henner *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 1998). Os PAHs apresentam-se amplamente distribuídos (Magi *et al.*, 2002) sendo que alguns autores referem-se a eles como marcadores antropogênicos, pois têm como principal fonte a combustão e a pirólise de combustíveis fósseis e madeira (Canton & Grimalt, 1992; Kowalewska & Konat, 1997). Sua deposição no ambiente é rápida pela associação com partículas, sendo que esta ligação é responsável pelo maior mecanismo de transporte de PAHs da superfície para a coluna d'água e sua acumulação no sedimento (Gogou *et al.*, 2000). A detecção e a dosagem química destes compostos implicam o uso de aparelhos de alta sensibilidade para determinar a presença de microdosagens biologicamente ativas com custo elevado de análise. No entanto, ensaios sensíveis que avaliem a presença da substância através da atividade biológica como, por exemplo, através da indução de mutação gênica, podem inferir a sua distribuição no ecossistema.

Ensaio que avaliam atividade mutagênica são utilizados como ferramentas na detecção da presença de compostos com potencialidade genotóxica em diferentes matrizes ambientais, constituindo-se em metodologias importantes na adoção de medidas preventivas e de proteção ao ecossistema.

1.2. Ensaio em sedimentos

Em geral, os contaminantes ambientais tendem a ser mais associados com a porção fina dos sedimentos (silte ou argila) do que com a grosseira (areia ou cascalho). Os sedimentos finos originam-se, em parte, das partículas orgânicas suspensas que adsorvem várias substâncias da coluna d'água. Uma vez depositados, são encobertos por sedimentos mais novos e a coluna d'água pode perder as ligações originais com as fontes de contaminantes (USEPA, 1994). Ainda em um contexto ecotoxicológico, a direção e a magnitude de adsorção de materiais particulados no sedimento podem determinar os movimentos dos contaminantes no ambiente, sua acumulação e sua biodisponibilidade (Knezovich *et al.*, 1987).

A distribuição de compostos químicos nos sedimentos depende, portanto, não somente das fontes locais, mas também dos processos naturais e antrópicos que redistribuem os sedimentos contaminados. A qualidade do sedimento em áreas de deposição pode refletir a história dos eventos de poluição que ocorreram por décadas. No entanto, os resultados obtidos de coletas restritas ao sedimento superficial (isto é, alguns centímetros) não representam exatamente a qualidade do sedimento na série histórica e, sim, uma deposição recente. Desta forma, o número, a posição e o tipo de amostras devem ser planejados para assegurar os objetivos a serem alcançados no estudo.

Sedimentos de ambientes erosivos consistem geralmente de areia grossa ou cascalho e apresentam uma probabilidade menor de contaminação em decorrência da ausência das porções finas. Já nos ambientes deposicionais onde existe uma baixa velocidade da corrente d'água e ressuspensão do sedimento, ou onde o transporte de contaminantes pelo fluxo ascendente é improvável, a contaminação do sedimento pode ser avaliada, coletando somente amostras de superfície. De fato, a menos que o transporte por fluxo ascendente seja

significativo, a liberação dos contaminantes para a coluna d'água ocorrerá somente na superfície de contato ou na interface sedimento-água (USEPA, 1994), permitindo a exposição de organismos aquáticos, animais selvagens e humanos, somente na camada superficial do depósito.

Historicamente, a avaliação da qualidade do sedimento foi limitada apenas a caracterizações químicas. Entretanto, a quantificação das concentrações dos contaminantes de forma isolada, não possibilita obter informações suficientes para avaliar as interações entre os produtos químicos e os organismos, a biodisponibilidade dependente do tempo e os potenciais efeitos adversos ao ecossistema. Portanto, a avaliação química de forma isolada apresenta limitações em sua habilidade de prever a toxicidade de misturas complexas (Brouwer *et al.*, 1990; Samoiloff *et al.*, 1983; Houk, 1992). A avaliação do risco potencial destes contaminantes é, freqüentemente, associada a análises químicas e/ou bioensaios de laboratório onde o foco principal de resposta é a possibilidade de toxicidade aguda (White *et al.*, 1996) e crônica. Contudo esta resposta somente representa o primeiro nível de impacto sobre o ecossistema aquático (Van Coillie *et al.*, 1989; De Raat *et al.*, 1985). É conhecido que muitas descargas industriais contêm substâncias que não desencadeiam um efeito agudo nos organismos alvo, mas são capazes de reduzir, ao longo do tempo, a sua sobrevivência, através de danos ao genoma, a células somáticas ou mesmo germinais (Houk, 1992).

Bioensaios para avaliar toxicidade em amostras de sedimento são técnicas relativamente novas, utilizadas em avaliações de risco ecológico. Os primeiros testes neste tipo de amostras foram desenvolvidos no final dos anos 60 e início dos 70 em decorrência dos interesses de corporações em dragar material contaminado e à conveniência em depositar seus rejeitos em mananciais hídricos (USEPA-USACOE, 1977). No final da década de 80, houve um aumento importante em sua utilização em diagnóstico ambiental (Burton, 1991).

O objetivo de um teste de toxicidade no sedimento é determinar, inicialmente, se este pode ser potencialmente prejudicial a organismos aquáticos. Estes organismos aquáticos medem respostas biológicas diretamente, esclarecendo efeitos tóxicos interativos de misturas complexas de contaminantes no sedimento (Kemp & Swartz, 1988). Testes de toxicidade em sedimento podem ser utilizados com diferentes finalidades, como por exemplo: definir áreas contaminadas; investigar as interações entre os contaminantes; determinar o relacionamento entre os efeitos observados e a biodisponibilidade de substâncias tóxicas; determinar o padrão espacial e a distribuição temporal da toxicidade; avaliar perigos em materiais dragados; monitorar a eficácia de ações de remediação e gerenciamento do ambiente.

Vários métodos foram desenvolvidos para avaliar a toxicidade do sedimento. Estes procedimentos variam na complexidade, desde testes de curto prazo para letalidade, que medem efeitos de substâncias químicas individuais em uma única espécie, até testes de longo prazo, que determinam os efeitos de misturas químicas na estrutura e na função das comunidades. Estes métodos podem incluir o sedimento inteiro, o sedimento suspenso, os eluatos ou os extratos químicos de sedimento (Lamberson & Swartz, 1992; Burton, 1991). Burton (1992) fornece uma revisão detalhada de métodos para avaliar a toxicidade do sedimento, suas vantagens, desvantagens, bem como considerações relacionadas às etapas de amostragem. Na literatura, está descrito um grande programa de estudos realizados pela USEPA (1994), referindo que a manipulação ou o armazenamento de amostras de sedimento total podem alterar a biodisponibilidade de contaminantes, sendo que estas alterações podem afetar substancialmente a toxicidade. Entretanto referem que o armazenamento de amostras coletadas a 4°C por diversos meses parece não resultar em mudanças significativas na química ou na toxicidade. Contudo, alguns autores (Burton, 1991; Stemmer *et al.* 1990) mostraram que podem ocorrer alterações no sedimento, dentro de dias ou semanas, de acordo com a natureza química do contaminante. Sedimentos contaminados por compostos orgânicos

não iônicos, semivoláteis mudam pouco com o armazenamento a 4°C, por possuir uma resistência relativa à biodegradação e à adsorção aos sólidos. Já os metais e os metalóides podem ser afetados através da mudança de potencial redox, oxidação ou metabolismo da fauna microbiana (como ocorre com o arsênio, selênio e mercúrio, os quais são metilados por várias bactérias e fungos), implicando em uma análise mais cuidadosa e rápida, sem que haja muita manipulação das amostras.

É importante destacar que o fracionamento químico do sedimento para análise tem a propriedade de separar grupos de compostos por afinidade orgânica a determinados solventes, permitindo simplificar a mistura de substâncias presentes no extrato e facilitar a observação das respostas química e biológica. A identificação de substâncias químicas específicas como resposta para atividade genotóxica em amostras ambientais é bastante difícil, uma vez que poucos compostos estão presentes em altas concentrações. Raramente as substâncias mais abundantes causam atividade genotóxica (Stahl, 1991). Muitas vezes, a ação não pode ser atribuída a compostos específicos da mistura, mas a um conjunto de propriedades e interações químicas da amostra como um todo (McGeorge *et al.*, 1983; Vargas, 1992). Estudos associando o ensaio *Salmonella*/microsoma e o fracionamento químico de amostras têm evidenciado que uma grande parte da atividade mutagênica de várias misturas complexas é causada por compostos de uma classe ou de poucas classes químicas presentes (DeMarini *et al.*, 1994; Vargas *et al.*, 1995, 1998 e 2001a). Portanto, a utilização de estratégias de abordagem distintas para o estudo da amostra ambiental, associadas a diferentes ensaios sensíveis a certos compostos, pode permitir a maior precisão na determinação de componentes da mistura através do seu efeito biológico.

Partindo destes princípios, a extração de compostos orgânicos por fracionamento químico associado à análise biológica de genotoxicidade, fornece uma resposta prática na

identificação de áreas contaminadas e na busca de medidas saneadoras, representando etapa importante no diagnóstico ambiental.

1.3 Informações relevantes das principais fontes poluidoras

O presente estudo avaliou a atividade mutagênica de sedimentos da região do Complexo Petroquímico do Sul. Implantado em 1982, no trecho final do Rio Caí (Triunfo, Rio Grande do Sul), este complexo industrial ocupa uma área de 3.600 hectares, empregando 6.300 pessoas, aproximadamente. O Complexo Petroquímico possui um sistema central de tratamento de efluentes líquidos, sendo que estes são separados em três correntes distintas - orgânica, inorgânica e pluvial não contaminada. Após pré-tratamento nas próprias indústrias, os efluentes são encaminhados ao Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes Líquidos (SITEL). Os efluentes orgânicos, inicialmente, passam por tratamento primário, com a remoção do material grosseiro e areias; secundário, com degradação biológica por sistema de lodo ativado; e terciário, com tempo de residência em sistema composto por oito lagoas de estabilização (LE₁ a LE₈) dispostas em série.

Os efluentes inorgânicos, constituídos principalmente por águas de purgas das torres de refrigeração e efluentes da unidade de desmineralização de água, são equalizados e integrados aos efluentes orgânicos na LE₁, sofrendo apenas tratamento terciário. A Lei Estadual 7.691, de 1982 (Rio Grande do Sul, 1982), dispõe sobre os procedimentos de disposição do efluente líquido tratado deste Complexo, que após o último estágio de tratamento (LE₈), é aspergido no solo (Figura 3.5), onde sofre os efeitos da evaporação, evapotranspiração e infiltração ou percolação no solo. A aspersão no solo é utilizada em duas áreas de 100 hectares, sendo que o uso da primeira iniciou-se em 1983. A outra área passou a

ser empregada a partir de 1993, nas proximidades do arroio Bom Jardim. No ano de 2000, foram aspergidos no solo cerca de 6.871.000 m³ de efluentes tratados (FEPAM, 2000).



Figura 1.1: Aspersores de efluentes líquidos no solo.

As águas pluviais não contaminadas são conduzidas para três bacias de acumulação e segurança e, posteriormente, ao rio Caí. Se ocorrer eventual contaminação, as bacias dispõem de dispositivos para retenção destas águas, sendo encaminhadas para diluição ou tratamento adequado. Estas bacias recebem, como contribuições, águas pluviais provenientes da área de estocagem e manuseio do carvão empregado nas caldeiras (bacia 3); água excedente das unidades de recuperação de cinzas do carvão (bacia 4); e lodo da estação de tratamento de águas do Complexo Petroquímico do Sul (bacia 7).

Os rejeitos sólidos produzidos no Complexo têm sua destinação final no Sistema Centralizado de Controle de Resíduos Sólidos (SICECORS). Em função dos riscos potenciais ao meio ambiente, os resíduos sólidos são classificados (comuns, inertes ou potencialmente perigosos) e dispostos em aterros sanitários, em valos de tratamento e disposição, em tambores ou nas fazendas de lodo. As cinzas geradas nas caldeiras com a combustão de carvão mineral são reutilizadas em processos de obtenção de cimentos; as lamas de catalisadores são confinadas em valas impermeabilizadas; e o lodo ativado resultante do

tratamento secundário é injetado subsuperficialmente no solo, na área das fazendas de lodo. Líquidos percolados resultantes da área do SICECORS são coletados em uma bacia de acumulação e encaminhados para tratamento.

Durante o projeto FEPAM/PADCT/FINEP (FEPAM, 2002) foram levantados os principais usos do solo da microbacia em estudo. Esta avaliação apontou que, na área, predominam os campos, sendo a pecuária e a agricultura de subsistência as principais atividades econômicas, além do extrativismo vegetal e dos reflorestamentos (figura 3.6).

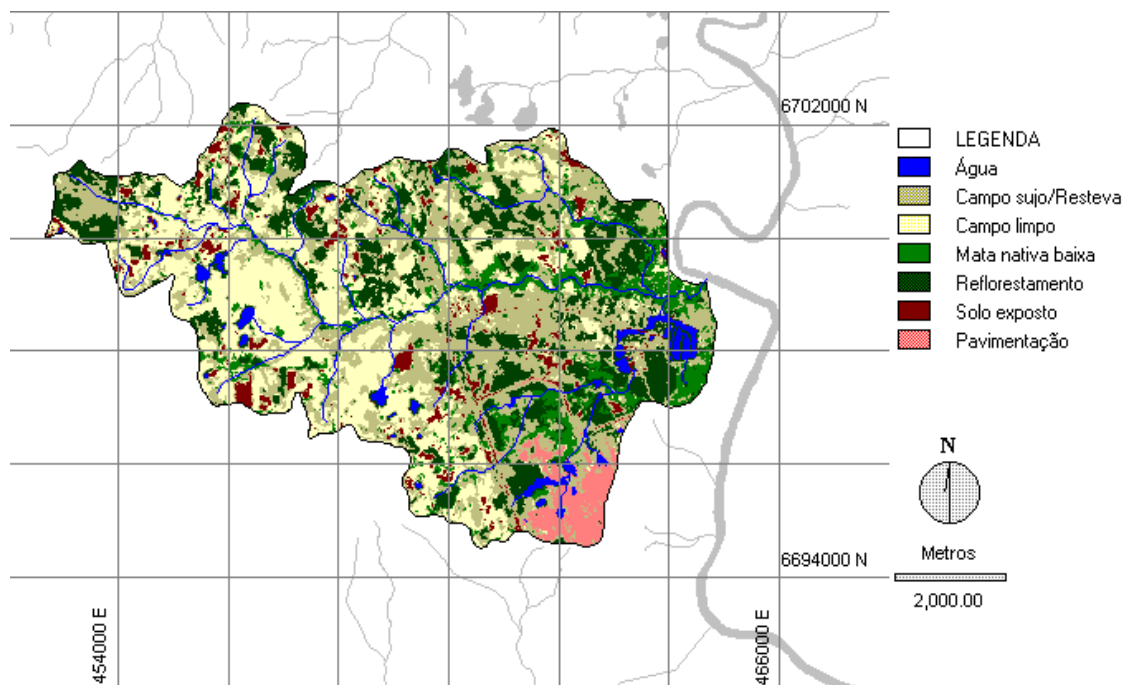


Figura 3.6: Mapa de usos do solo da microbacia do arroio Bom Jardim.

FONTE: FEPAM, 2003.

A FEPAM tem desenvolvido um programa de avaliação ecotoxicológica desta área desde 1983. No período de 1983-1997, foram realizados vários estudos, abrangendo os compartimentos aquático e aéreo, que evidenciaram liberação de substâncias genotóxicas, citotóxicas e com atividade tóxica crônica, em organismos de diferentes níveis biológicos (Vargas *et al.*, 1988; 1993; 1995; Vargas, 1992; Lemos *et al.*, 1994; FEPAM, 1997). Até o

momento, porém, o sedimento ainda não fora objeto de estudos para avaliar a presença de substâncias com ações mutagênica e citotóxica.

A associação entre estudos de mutagenicidade de amostras ambientais de diferentes compartimentos, incluindo os sedimentos, é importante, considerando que:

- as substâncias se dispersam nos ecossistemas de acordo com suas propriedades físicas e químicas e nestes interagem entre si e com os diferentes organismos;

- o nível de exposição a agentes genotóxicos geralmente são baixos e por longos períodos, com possibilidade de bioacumulação e biotransformação;

- a possibilidade de avaliar de forma comparativa, utilizando ensaios diretos ou associando sistema de metabolização hepática externa, permite uma estimativa do efeito da poluição industrial sobre populações aquáticas naturalmente expostas e uma possível repercussão em mamíferos e na cadeia alimentar;

- a atividade mutagênica pode afetar populações mais suscetíveis, diminuindo a variabilidade genética da população local.

2. OBJETIVOS

O presente estudo é parte do Projeto “Estratégias Ecotoxicológicas de Avaliação de Risco, FEPAM/EcoRISCO/PADCT/FINEP” atualmente em finalização na FEPAM.

Os objetivos específicos deste trabalho buscaram:

- avaliar a atividade mutagênica e citotóxica do sedimento do arroio Bom Jardim através do ensaio *Salmonella*/microsoma, pelo método de microsusensão, em presença e ausência de sistema de metabolização exógena;
- determinar o comprometimento da área em relação aos compostos com ações mutagênica e citotóxica, avaliando suas distribuições espacial e temporal;
- subsidiar o Órgão de Proteção Ambiental do Estado na avaliação do impacto de risco da área de maior influência do Complexo no ambiente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Pontos de amostragem

As amostras de sedimento foram coletadas em três locais (Figura 3.1) definidos através de trabalho de campo, no arroio Bom Jardim (Projeto FEPAM/EcoRISCO/PADCT/FINEP em finalização):



Figura 3.1: Mapa da área e seus pontos amostrais.

FONTE: FEPAM, 2003.

- Ponto BJn (referência) (6697480N; 455403L) – Açude formador do arroio Bom Jardim, localizado a montante da área de aspersão do efluente final líquido tratado oriundo de atividades petroquímicas (Figura 3.2).



Figura 3.2: Ponto BJn

- Ponto BJ002 (6699153,0N; 462318,4L) – Local em frente à área de aspersão do efluente líquido tratado, recebendo ainda a contribuição da drenagem da área de disposição da fazenda de lodo e resíduos sólidos (Figura 3.3).



Figura 3.3: Ponto BJ002

- Ponto BJ000 (6699095,5N; 464596,0L) – Foz do arroio Bom Jardim próximo ao Rio Caí, recebendo contribuição de águas de drenagem provenientes das áreas de disposição final do

efluente líquido, da fazenda de lodo e do sistema integrado de tratamento de rejeitos do Pólo Petroquímico (Figura 3.4).



Figura 3.4: Ponto BJ000

3.2. Coletas

As coletas foram realizadas, nos três locais descritos, durante o ano de 1999 (verão em janeiro, outono em abril, inverno em julho e primavera em outubro) e 2000 (somente verão em novembro). Nas amostragens, foi utilizado um sistema coletor em PVC de 100mm de diâmetro em forma de “L” (figura 3.7). Consistiu em 2 a 3 passagens do coletor no sedimento, sendo a amostra homogeneizada em bandeja, sendo armazenado em média 1kg de amostra. As amostragens foram realizadas pela equipe do Setor de Amostragens da Fundação Estadual de Proteção Ambiental de acordo com o APHA (1992). Foram coletadas amostras de sedimento superficial, representando uma deposição recente, sendo estocadas em câmara fria (4°C), ao abrigo da luz até a extração química e posterior análise de mutagenicidade e citotoxicidade.



Figura 3.5: Coletor em PVC utilizado nas coletas.

3.3. Extração de compostos químicos orgânicos

3.3.1. Extração úmida de sedimento

A extração de compostos orgânicos foi adaptada de White *et al.* (1998) e realizada por especialista de área de química participante do grupo de pesquisa. As amostras foram homogeneizadas, sendo retirada uma alíquota de 50g, acrescida do solvente diclorometano grau pesticida (100ml) e submetida à extração por ultra-som (Thornton – GA/TA, 4 ciclos de 3 minutos). Os extratos foram pré-filtrados em lã de vidro e sulfato de sódio anidro, sendo filtrados em coluna cromatográfica (sulfato de sódio anidro e celite 545). Posteriormente a amostra foi concentrada até um volume aproximado de 15ml em aparelho concentrador rotatório (rota-vapor a 40°C – Yamato RE 52). Na figura 3.8 está apresentado um esquema da extração realizada.

Os extratos concentrados foram acondicionados em tubos de *kuderna danish* graduados, retirando-se uma alíquota de 1ml para a determinação do material orgânico extraído. Neste processo, a amostra foi submetida à secagem em estufa a 100°C sendo a massa determinada por diferença em balança eletrônica analítica de cinco casas decimais (Sartorius BP211D). Os extratos foram acondicionados à temperatura de -4 °C, até o momento da análise. Todos as extrações foram realizadas na Divisão de Química da FEPAM.

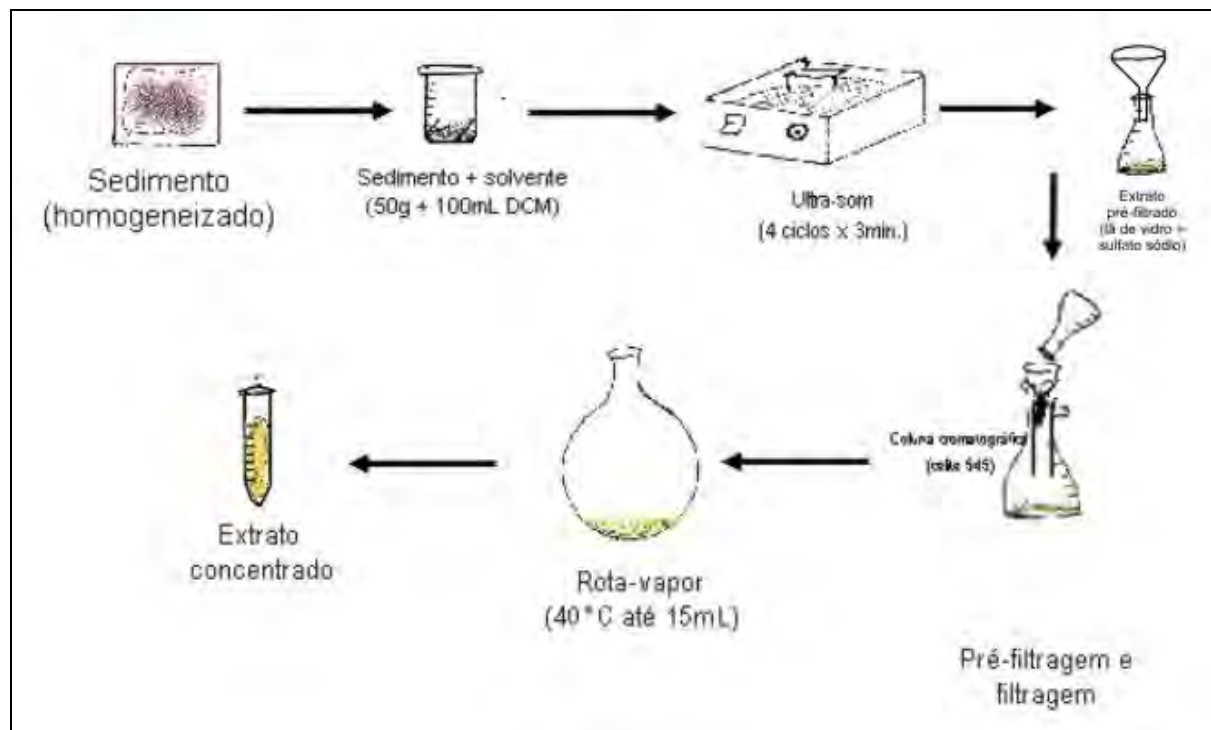


Figura 3.6: Diagrama de realização da extração úmida de sedimento.

3.4. Análise de granulometria

A análise granulométrica do sedimento foi realizada no Laboratório do Centro de Estudos Costeiros, Instituto de Geociências da UFRGS. A granulometria do sedimento consistiu na separação das principais classes texturais dos sedimentos grossos e finos. Para os sedimentos grossos (> 0,0625 mm), foi empregado um conjunto de peneiras segundo as

escalas de Wentworth/Krumbein (Wentworth, 1922; Krumbein, 1934) e, para os sedimentos finos ($< 0,0625$ mm), correspondentes às frações silte e argila, foi empregado o método da pipetagem (figura 3.9), baseado na lei de sedimentação de Stokes (Stokes, 1851), sendo classificados como cascalhos, areias, silte e argila.

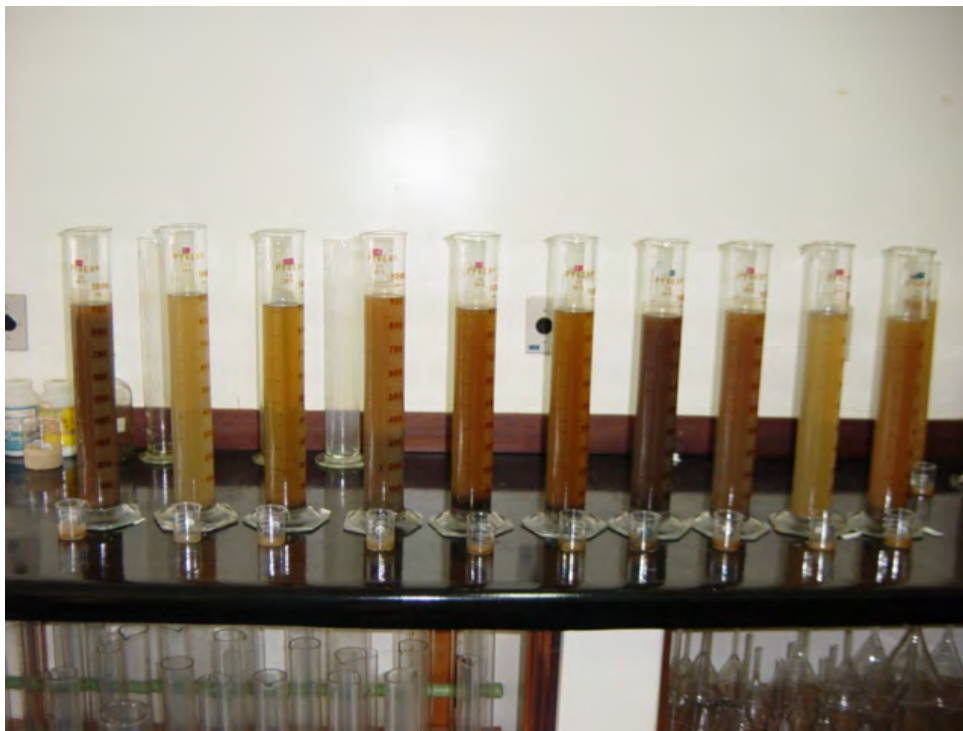


Figura 3.7: Análise granulométrica de materiais finos

3.5. Avaliação da mutagenicidade

3.5.1. Princípio do método

O ensaio de mutagenicidade em *Salmonella typhimurium* foi desenvolvido por Ames (1971), sendo revisado por Maron & Ames (1983) e modificado por Kado *et al.* (1986) criando o método de microsusensão. Na literatura, foram ainda publicadas revisões por

Gatehouse *et al.* (1994) e Mortelmans & Zeiger (2000). O mecanismo básico do teste é determinar alterações na molécula de DNA, no *operon* da histidina, causadas por mutações reversas para prototrofia, tendo como marcador o requerimento a este aminoácido, sendo possível detectar mutações do tipo erro no quadro de leitura e substituição de pares de bases (figura 3.10). São utilizadas diferentes linhagens derivadas da parental LT-2 modificadas geneticamente (tabela 3.1).

Tabela 3.1: Linhagens bacterianas utilizadas no ensaio de mutagenicidade.

Cepa	Sítio da mutação histidina			Mutação	deleção	plasmídios	Tipos de Danos
	<i>hisD6610</i>	<i>hisG46</i>	<i>hisD3052</i>	<i>rfa</i>	<i>uvrB</i>	fator R	
TA 97a	+	-	-	+	+	+	Erro no quadro de leitura
TA 98	-	-	+	+	+	+	
TA 100	-	+	-	+	+	+	Substituição Pares de bases
TA 1535	-	+	-	+	+	-	

Legenda: (-) ausência e (+) presença do genótipo.

FONTE: Vargas *et al.*, 2001b (modificado).

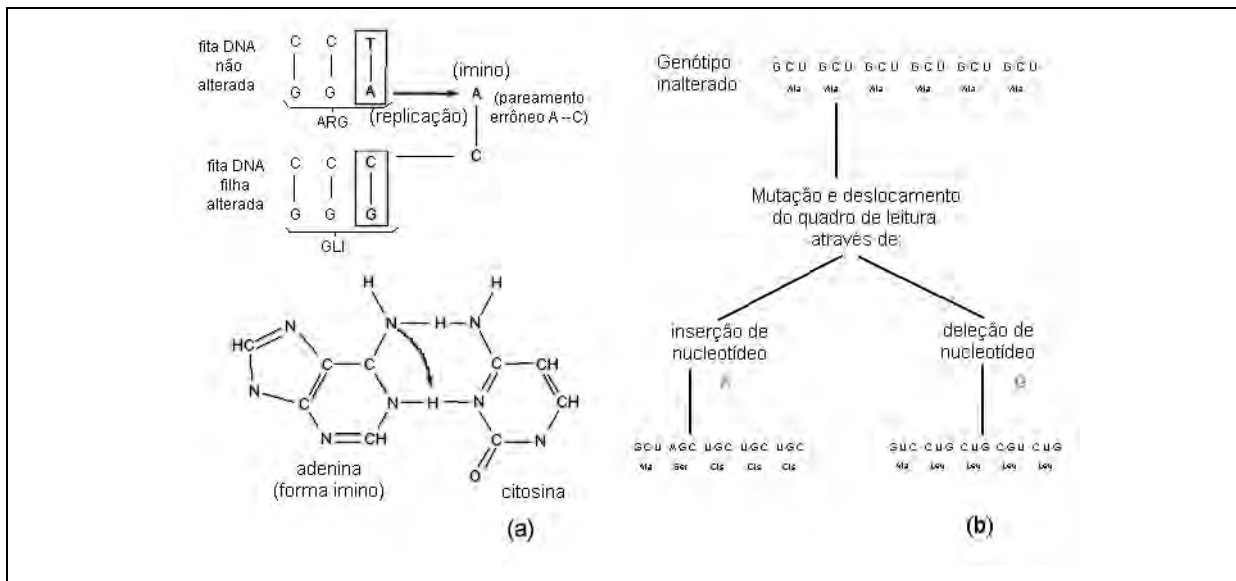


Figura 3.8: Diagramas do mecanismo de ação de mutações do tipo substituição de pares de bases (a) e deslocamento do quadro de leitura (b)

FONTE: Vargas *et al.*, 2001b.

3.5.2. Controle dos marcadores genéticos dos organismos bioindicadores

As características genéticas das linhagens bacterianas necessitam ser verificadas a cada dois meses, ou quando suas características se alteram espontaneamente. Os ensaios verificam a manutenção de:

- Dependência à histidina e à biotina

Alíquotas das culturas são estriadas em placa-teste, contendo biotina, e em placa controle, com 0,1 ml de histidina (0,1 M) e de biotina (0,5 mM). Após incubação a 37°C, por 24h, deve-se observar ausência de crescimento nas placas-teste.

- Presença de plasmídios

A resistência à ampicilina é detectada pela presença do plasmídio pKM101 que contém o gene *mucAB*. Culturas resistentes e sensíveis são estriadas em placas ágar nutriente acrescidas de ampicilina. Após incubação a 37° C, deve-se observar o crescimento das linhagens portadoras do plasmídio de resistência.

- Permeabilidade da membrana plasmática (mutação *rfa*)

A permeabilidade celular a um número maior de compostos químicos é devida a uma mutação gênica induzida, que altera a camada lipopolissacarídica da membrana celular bacteriana. Uma alíquota de 100 µl das linhagens, em ágar de superfície (45°C), é semeada em placa ágar nutriente. Em pequeno disco de papel filtro estéril, colocado no centro da placa, é adicionado 10 µl de solução de cristal violeta. Após 12 horas de incubação, a 37 °C, observa-se zona de inibição do crescimento.

- Mutação *uvrB*

O sistema de reparo de excisão bacteriano foi alterado através de mutação gênica induzida tornando-o mais sensível a certos tipos de agentes mutagênicos, devido à impossibilidade de correção do evento mutacional. Estrias de culturas com a mutação *uvrB* são realizadas em placas ágar nutriente. Metade da placa é coberta, sendo a outra irradiada com luz UV (15 W-germicida) à distância de 33 cm, por 8 (TA100, TA98, TA97a) ou 6 segundos (TA1535). Após incubação de 12-24 horas, a 37° C, deve-se constatar crescimento na metade não irradiada da placa para as linhagens.

- Mutação espontânea e induzida

A repetibilidade do ensaio, ao longo dos anos, estabeleceu faixas de revertentes tanto induzidas como espontâneas. As linhagens são testadas em presença e ausência de fração S9Mix. Mortelmans & Zieger (2000) apresentam como valores históricos aceitáveis em revertentes/placa (-S9): TA97a (75-200), TA98 (20-50), TA100 (75 –200), TA1535 (5-20); (+S9): TA97a (100-200), TA98 (20-50), TA100 (75 –200), TA1535 (5-20).

3.5.3. Ensaio de mutagenicidade

Os protocolos mais empregados na detecção de mutagenicidade utilizam o ensaio *Salmonella*/microssoma. Kado *et al.* (1986) desenvolveram uma modificação no ensaio original, possibilitando seu uso para avaliação de pequenas quantidades de amostra. Esta variação inclui um período de pré-incubação de 90 minutos, a 37°C, elevando a sensibilidade para alguns compostos e é denominada de método de microssuspensão ou Teste de Kado. A cultura bacteriana (crescida em meio nutriente específico, por período de 16 horas), tem sua

concentração determinada por espectrometria em 0,35-0,40 de absorvância no comprimento de onda de 650nm, representando uma densidade de 1 a 2×10^9 células por ml. Após este procedimento, é realizada a concentração da cultura bacteriana por meio de centrifugação a 10.000g por 10min a 4°C, ressuspensando-se o precipitado em volume 10 vezes menor (cultura a 1 a 2×10^{10} cél./ml). Cada uma das dosagens que compõe a curva dose-resposta (2,5µg; 10µg; 40µg e 80µg) dos extratos de sedimento é pré-incubada juntamente com uma alíquota de 100µl da cultura bacteriana (por 90 minutos), sendo, posteriormente, solidificada em placas de meio restritivo por meio de uma solução de ágar de superfície, contendo traços de histidina e biotina. A concentração de histidina adicionada é necessária para as primeiras divisões celulares, formando uma linha de base de crescimento bacteriano, mas não suficiente para produzir colônias individuais. As placas são incubadas no escuro, por 72 horas, à temperatura de 37°C, em estufa bacteriológica (figura 3.11). Após este período, o número de colônias revertentes por placa é registrado em protocolo específico. Os ensaios são realizados com luz amarela para prevenir a fotoativação e fotodesativação das substâncias. Em todas as baterias, são adicionados os controles negativos para titulação da cepa (meio nutriente líquido), o solvente utilizado no ensaio, os controles positivos (azida sódica - AZS, CASRN. 26628-22-8; 2-aminofluoreno - 2AF, CASRN. 153-78-6 e 4-nitroquinoleína-1-óxido - 4NQO, CASRN. 56-57-5), de acordo com a cepa e o tratamento utilizado e os controles de esterilização necessários.

Os ensaios são realizados, pelo menos em duplicata, com repetição da curva dose-resposta, em presença e ausência de um sistema de ativação metabólica exógeno obtido a partir de tecidos de mamíferos. O sistema mais comumente utilizado é obtido a partir de fígado de rato Sprague-Dawley, induzido pela substância Aroclor 1254 (mistura bifênil policlorinada-PCB), produzido por centrifugação a 9.000g, resultando na fração S9 de

enzimas microssomais hepáticas (Maron & Ames, 1983). A fração utilizada no presente trabalho foi adquirida comercialmente sob forma liofilizada (MOLTOX S.A.).

A realização de ensaios em presença e ausência de fração S9 permite o diagnóstico dos compostos que possuem ação direta no DNA e dos que requerem um sistema de metabolização de mamíferos para serem ativados, ou seja, mutágenos de ação indireta ou pró-mutágenos. É importante destacar que alguns compostos com ação direta podem ser desativados pelo sistema metabólico atuando como protetor biológico (Weisburger, 1999). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Mutagênese Ambiental da Divisão de Biologia da FEPAM.

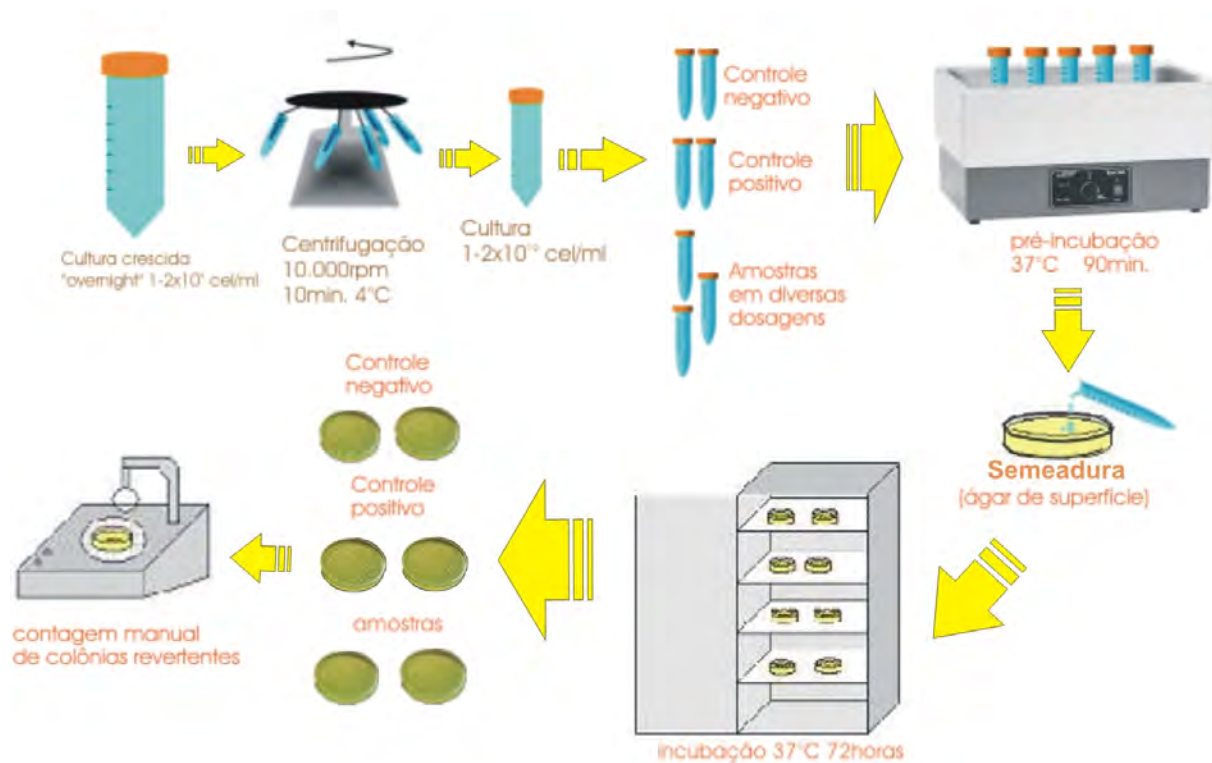


Figura 3.11: Esquema do método de ensaio de determinação de mutagenicidade.

3.5.4. Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade da substância testada pode ser um interferente importante no ensaio de avaliação mutagênica, mascarando resultados e gerando falsas respostas negativas, devendo ser avaliado concomitantemente. No ensaio de citotoxicidade, a mistura cepa-amostra é diluída com tampão fosfato a uma concentração de 1 a 2×10^2 células/ml e semeada em meio nutritivo completo, sendo o número de colônias registrado após incubação por 72 horas, a 37°C (Vargas *et al.*, 1988). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Mutagênese Ambiental da Divisão de Biologia da FEPAM.

3.5.5. Avaliação dos resultados

3.5.5.1. Cálculo do índice de atividade mutagênica (IM)

Para efeitos de comparação entre diferentes amostras, foi calculado um índice de mutagênese. Este foi obtido através da razão entre a média de revertentes por placa da amostra testada e a média do número de revertentes espontâneos observados no ensaio, segundo Vargas (1992):

$$\text{IM} = \frac{\text{Média de revertentes/placa da amostra}}{\text{Média de revertentes/placa do controle negativo}}$$

3.5.5.2. Cálculo do percentual de sobrevivência celular

A resposta foi comparada ao número de colônias observadas em ensaio realizado frente à amostra e ao controle negativo da bateria de testes. Uma taxa menor do que 60% de colônias sobreviventes na amostra em relação ao controle indica citotoxicidade.

$$\text{SOB (\%)} = \frac{\text{Sobreviventes da amostra}}{\text{Sobreviventes do controle negativo}} \times 100$$

3.5.5.3. Critérios de avaliação do ensaio

Resposta Mutagênica: O critério final a ser utilizado para interpretação e avaliação dos resultados neste ensaio, leva em consideração o valor de reversão igual ou maior do que duas vezes a taxa de mutação espontânea da linhagem, a significância entre as dosagens (ANOVA, $p \leq 0.05$) e a curva dose-resposta reproduzível com inclinação significativamente positiva ($p \leq 0,05$) avaliadas pelo programa SALMONEL (Myers *et al.*, 1991).

Resposta Indicativa de Mutagênese: A amostra foi considerada indicativa de mutagenicidade quando apresentou duas vezes a mutação espontânea ou ANOVA e relação dose-resposta significante ($p \leq 0,05$).

Resposta Citotóxica: A amostra é considerada citotóxica quando a sobrevivência celular for inferior a 60% daquela observada no controle negativo.

Resposta Negativa: A amostra é classificada como negativa quando apresenta mutagenicidade menor do que duas vezes o valor espontâneo, curva dose-resposta não significante e ensaio de sobrevivência celular maior do que 60%.

3.5.5.4. Expressão de resultados

As respostas para atividade mutagênica podem ser apresentadas sob forma do número de colônias revertentes *HIS*+/placa, de índice de mutagênese e revertentes induzidos por unidade de amostra testada.

As respostas para atividade citotóxica são apresentadas em percentuais de sobrevivência da amostra em relação ao observado no controle negativo.

3.6. Avaliação estatística

3.6.1. Avaliação estatística da curva dose-resposta do ensaio de microsuspenção

As curvas dose-resposta obtidas no ensaio *Salmonella*/microsoma são avaliadas por uma série de análises e modelos estatísticos (Claxton, 1997). Entre estes é bastante utilizado e aceito internacionalmente o programa SALMONEL, elaborado por Myers *et al.* (1991) e descrito em Vargas *et al.* (1993). Este programa prevê que a relação dose-resposta destes ensaios, em qualquer das linhagens utilizadas ou condições de metabolização, pode ser enquadrada em pelo menos quatro modelos de regressão: CONSTANTE $y = b$; LINEAR $y = bx+a$; LINTOX1 (linear atenuado por toxicidade exponencial simples) $y = (bx+a)^{-T_1X}$; LINTOX2 (linear atenuado por toxicidade exponencial elevada à segunda potência) $y = (ax+b)^{-T_2X^2}$. Ainda, este programa considera o modelo BERNSTEIN (Bernstein *et al.*, 1982) que consiste em retirar da análise uma ou mais doses, usando somente os resultados compatíveis com o modelo linear.

Através desta análise, pode-se obter o cálculo e a significância estatística de:

- Análise de variância entre as médias do número de revertentes nas diferentes doses testadas (teste F ajustado), em que valores de P menores ou iguais a 0,05 indicam diferenças significativas;

- Ajuste ao modelo mais aceitável em que os valores de P indicam a probabilidade de ajuste ao modelo mais adequado. Quando estes valores são inferiores a 0,05, o programa somente calcula a análise de variância.

- Cálculo da positividade da curva dose-resposta no qual os valores de P menores ou iguais a 0,05 indicam que existe inclinação positiva na origem da curva. Quando ocorre inclinação positiva significativa na origem da curva dose-resposta, podemos levar em consideração outros parâmetros calculados pelo programa. A inclinação da reta na parte linear da curva dose-resposta fornece a estimativa do número de revertentes induzidos por unidade de amostra testada.

O programa estabelece ainda o erro padrão e o intervalo de confiança de 90% desta determinação. No anexo II está apresentado uma saída do software SALMONEL.

4. ARTIGO: DETERMINATION OF SEDIMENT MUTAGENICITY AND CYTOTOXICITY IN AN AREA SUBJECT TO PETROCHEMICAL CONTAMINATION

Rubem Cesar Horn^{1,2} Jocelita Aparecida Vaz Rocha² and Vera Maria Ferrão Vargas^{1,2}.

¹Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

²Programa de Pesquisas Ambientais, Divisão de Biologia, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler, Av. Dr. Salvador França, 1707, CEP 90690-000 Porto Alegre-RS, Brasil, Telephone/Fax +55-51-334-6765. E-mail: rubemch@fepam.rs.gov.br

Corresponding author: Rubem Cesar Horn - Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler, Av. Dr. Salvador França, 1707, CEP 90690-000 Porto Alegre-RS, Brasil, Telephone/Fax +55-51-3334-6765. E-mail: rubemch@fepam.rs.gov.br

Keywords : Sediment, *Salmonella* microassay, mutagenicity, environment.

Abstract

This study presents an evaluation of the mutagenic and cytotoxic activity of sediment in Bom Jardim stream, one of the contributors to the Caí River basin, RS, Brazil. This stream receives the indirect contribution of treated effluent from a petrochemical industry plant. The *Salmonella*/microsome assay, a microsuspension method, was used to evaluate moderately polar extracts of sediment samples at three points along the stream. The grain size analysis showed a lower mean content of fine particles in front of the complex, and this was also the sampling point with the lowest percentage of extracted organics. The bioassay results showed that there has been ecotoxicological degradation of the stream as the first area of impact of the petrochemical complex on the environment. Low mutagenic activity has been observed at the different sites studied, ranging from 3.3% to 8.3%, cytotoxic activity being the most important in the area, ranging from 20% to 40%, adding up the results of assays in the presence and absence of external metabolization. In assays without metabolization, there were more frequent responses for mutagenesis and cytotoxicity, with more frequent damage of the frameshift error type. The results also showed that there was a gradual, seasonal distribution of the responses as one approaches the stream mouth, the most compromised points being in front of and downstream from the complex. Mutagenic and cytotoxic activity in sediment samples has proved important to determine the environmental quality, despite the complexity of the chemical composition of the environmental matrix. Furthermore, the *Salmonella*/microsome assay monitoring molecular damages and, mainly cytotoxicity, helped diagnose the presence of pollutants, and it is an important tool, aiming mainly at actions to preserve the genetic heritage of the fauna and flora affected by anthropic activity and the improvement of environmental quality.

4.1. INTRODUCTION

Compounds for environmental or individual use, such as pesticides, agricultural inputs, food additives, pharmaceuticals and chemotherapeutic agents, as well as a complex sample resulting from the sum between the natural and anthropic contribution, have been diagnosed as presenting toxic properties that induce genetic damage. The levels of exposure to these agents are generally low and last a long time, with a possibility of bioaccumulation and biotransformation, putting the integrity of the environment and human health at risk (Vargas *et al.* 2001a). Chemical contamination may also cause population reduction due to effects of somatic and heritable mutations, as well as to non-genetic toxicity, speeding up stochastic processes in small populations due to the increased frequency of mutations, and reducing the fitness of these individuals (Bickham *et al.* 2000).

A large number of studies, with different approaches, studying interstitial surface waters and sediments have verified the contamination of sources with complex mixtures of toxic substances that could induce genetic damage (Loper, 1980; Meier, 1988; Valent, 1990; Houk, 1992; Stahl, 1991; Claxton *et al.*, 1998; Vargas *et al.*, 1993; 2001b). Generally, the contaminants tend to be more associated with the fine portion (silt or clay) than with the larger sediments (sand or gravel). The fine sediments are partly originated from the suspended particles that adsorb several contaminants in the water column until they are deposited at the bottom. Once they have been deposited, they are overlaid by new layers of sediments and the water column thus loses the original connection to the sources of contaminants (USEPA, 1994). The distribution of chemical contaminants in the sediments depends not only on localized or diffuse sources, but also on natural and anthropic processes that redistribute the contaminated sediments. Sediment quality in deposition areas may reflect the history of pollution events that occurred over decades or in a recent period in the surface layer (USEPA,

1994). A significant portion of these pollutants is deposited in the sediment by adsorption, flocculation and sedimentation, constituting potential sources of chemical contamination of the water column (Bonnet, *et al.* 2000).

It is very difficult to identify specific chemicals as a response to genotoxic activity in environmental samples, since few compounds are present at high concentrations. Rarely, the more abundant substances cause genotoxic activity (Stahl, 1991). Often the action cannot be attributed to specific compounds of the mixture but to a set of chemical properties and interactions of the sample as a whole (McGeorge *et al.*, 1983; Vargas, 1992).

This study presents an evaluation of the sediment of Bom Jardim Stream, one of the contributors to the Caí river basin in Rio Grande do Sul (RS), Brazil, which receives the indirect contribution of treated effluents from a petrochemical industry complex. This area was evaluated previously using samples of surface water in a *Salmonella*/microsome assay, and the presence of base pair substitution and frameshift mutagens was diagnosed (Vargas *et al.*, 1988; 1993; 1995; FEPAM, 1997). Sediment evaluation along the stream supplies a diagnosis of the ecotoxicological impact on the area, as deposit of certain groups of compounds with toxic and genotoxic properties over time.

4.2. MATERIALS AND METHODS:

4.2.1. Chemical substances

The mutagenic substances used in this study were sodium azide (AZS, CASRN. 26628-22-8), dichlorometane (DCM, CASRN. 75-09-2) from Merck do Brazil; 2-aminofluorene (2AF, CASRN. 153-78-6) and 4-oxide-1-nitroquinoline (4NQO, CASRN. 56-57-5), Glucose-6-phosphate (G-6-P) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

(NADP) from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO and dimethylsulfoxide (DMSO, CASRN. 67-68-5) from Riedel and Rödel. A metabolic activation fraction (S9 MIX) purchased from MOLTOX (Molecular Toxicology Inc., Boone, NC), was prepared from Sprague-Dawley rat livers pretreated with AROCLOR 1254.

4.2.2. Study areas

Five samplings were performed at three points in Bom Jardim Stream, RS, Brazil, which drains the effluent disposal area of the Petrochemical Complex, during 1999 (summer, spring, autumn and winter) and 2000 (summer). The samples of surface sediment were collected and stored in a cold chamber (4° C), sheltered from light until chemical extraction was performed.

The sampling sites are defined in Figure 4.1:

- Point BJn (6697480N; 455403L) – One of the ponds that form the Bom Jardim Stream, located upstream from the area influenced by the deposition of the industrial effluents.

- Point BJ002 (6699153,0N; 462318,4L) - The location in front of the area where the treated liquid effluents were sprayed.

- Point BJ000 (6699095,5N; 464596,0L) – Mouth of Bom Jardim Stream close to the Caí River receives drainage water from final disposal areas of the liquid effluent, from the sludge farm and integrated industrial waste treatment system.

4.2.3. Wet extraction of sediments

The extraction of organic compounds was adapted from White *et al.* (1998). The samples were homogenized, and a 50g aliquot was removed. Extraction was performed by ultrasound (4 3-minute cycles), using the pesticide grade solvent dichloromethane (total of 100 ml). The extracts obtained were pre-filtered in glass wool and anhydride sodium sulfate, and filtered in a chromatographic column (anhydride sodium sulfate and celite 545). Later the sample was concentrated until a volume of approximately 16 ml was achieved in a rotary evaporator (at 40°C), and the mass of extracted organic matter was determined.

4.2.4. Grain size analysis

Grain size analysis used the Wentworth/Krumbein method (Wentworth, 1922; Krumbein, 1934) and Stokes (1851) and they were classified as gravels, sands, silt and clay. All analyses were performed in the Sedimentology Laboratory of the Federal University of Rio Grande do Sul.

4.2.5. Mutagenic and cytotoxicity evaluation assay

The *Salmonella*/microsome microsuspension method assay also called Kado Test was used (Kado *et al.*, 1986) using the TA97a, TA98, TA100 and TA1535 strains. The bacterial culture ($1-2 \times 10^{10}$ cell/ml) was pre-incubated with an aliquot of the chemical extract of the sediment sample for 90 min, at 37°C, and the mixture was later solidified by means of a surface agar solution containing traces of histidine and biotin (Maron and Ames, 1983). The

plates were incubated for 72 hours at 37°C in a bacteriological chamber. The samples were evaluated at least in duplicate in the presence and absence of an exogenous metabolic activation system, S9 mix. In all assays, negative (100 µl buffer) and positive controls (sodium azide – 5µg/plate; 2-aminofluorene – 5 µg/plate and 4-oxide-1-nitroquinoline – 0.5 µg/plate) were added according to the strain and treatment utilized, accompanied by a cellular viability assay (Maron and Ames, 1983; Vargas *et al.*, 1988).

4.2.6. Statistical analysis

The sample was considered positive when the induced mutation values reached double the mutagenic activity observed in the negative control, a significance between the doses (ANOVA, $p \leq 0.05$) in the presence of a significant elevation in the dose-response relation evaluated by the SALMONEL program (Myers *et al.*, 1991). The sample was considered indicative of mutagenicity when it presented twice the spontaneous mutation or ANOVA and significant dose-response relation. In the cell viability test, the responses were considered cytotoxic when the percentage of survival in the sample was less than 60% of that observed in the negative control (Vargas *et al.*, 1993)

4.3. RESULTS

The mutagenic activity responses observed in the different sampling periods are compared in figures 4.2 to 4.5, for assays in the absence (Figures 4.2 and 4.4) and in the presence of exogenous metabolization (figures 4.3 and 4.5), both for mutagenic responses of the frameshift error type (figure 4.2 and 4.3) and base pair substitution (figures 4.4 and 4.5).

Results indicating direct mutagenic activity of the frameshift error type were observed in the assays with strains TA98 (figure 4.2), BJ000 (sampling II) and for TA97a at BJ000 (Sampling II and III). In assays in the presence of an exogenous metabolism fraction (Figure 4.3), indicative mutagenic activity can be observed in a sampling of all points evaluated BIn (IV), BJ002 (I) and BJ000 (III) in strain TA98. No mutagenic activity was observed for strain TA97a.

Mutagenic activity indicating the base pair substitution type was observed at least once at all sampling points, and was diagnosed in TA100 at BIn (I) and BJ000 (I) and at TA1535 at BJ0002 (II) for direct assays (figure 4.4). In the presence of a S9mix fraction (figure 4.5) this type of activity was observed only for assays with strain TA1535 at BIn (V).

Generally a higher frequency of the frameshift mutations can be observed (figure 4.6) as to the base pair substitution in the responses observed adding up the results of the strains used. The most frequent responses were detected at sampling station BJ000. The seasonal distribution showed a decrease in the mutagenic activity throughout the sampling period (figure 4.7) and higher activity in the absence of external metabolism (figure 4.8). The change in the type of action of the mutagenic compounds should be noted. More direct activity occurred in summer and autumn and during the other seasons indirect compounds activity was seen.

Cytotoxic activity was monitored in all assays and proved to be the most significant parameter in the area studied. Analyzing the data according to the season of the year, there was more marked activity in summers, and it was absent in spring (figure 4.9). A gradient of responses as summer>winter>autumn>spring may be observed. The most compromised sampling point was BJ000, presenting a higher percentage of cytotoxic responses. In addition, more activity was observed in the direct assays, i.e., without external metabolism, both according to the occurrence at sampling points and in seasonality (figure 4.10).

The results of grain size analysis (Figure 4.11) showed that point BJ002 presented a higher sand content (72.65%) as compared to other sampling points (BJn-57.38% and BJ000=61.53%). This result consequently caused a lower concentration of compounds presenting on the average 2 times less organic material extracted as compared to points BJn and BJ000 (figure 4.12).

4.4. DISCUSSION

The results of grain size analysis made it possible to show the importance of the matrix that forms the sediment in the percentage of organic compound adsorption. A lower content of clays and silts that are more porous materials showed a lower adsorption of compounds, evidenced by low values of extracted organic mass (figure 4.11). Therefore, the physical aspects of the sediment samples are relevant factors for the diagnosis of the contamination of this environmental compartment, since the chemical compounds are associated mainly to the fine fraction of sediments (clays and silts) (USEPA 1994). Further, contaminated sediments may be directly toxic to aquatic life or could be a source of contaminants for bioaccumulation in the food chain (USEPA, 2000)

The results obtained show that there is mutagenic and cytotoxic activity dispersed throughout the area of study. The main activity of this region is petrochemical, and the points in front of and downstream from the area where the greatest deposition of treated effluents occurs, were the sites that presented the greatest degradation of environmental quality (BJ002 and BJ000) defined by the presence of mutagenic and cytotoxic activity. These results observed at the mouth of the stream (BJ000) agree with previous studies on surface water (Vargas *et al.*, 1993; FEPAM, 1997), as being the site of highest incidence of positive responses in the Caí river basin. They also agree with the results observed in water samples

collected at the same sites and on the same collection dates, and evaluated by the classical *Salmonella*/microsome test. In this associated study (Cardozo *et al.*, 2001; Vargas *et al.*, 2003) a higher percentage of mutagenic samples was observed at the two sites with the greatest environmental degradation.

In the present study, activity indicating mutagenicity was also observed at the reference point upstream from the complex area (BJn). This activity may be related to the atmospheric pollution generated by the complex, since the area investigated is present in the main pollutant dispersion plume of this area (Ducatti *et al.*, 2001). The chemical extraction of the samples using a specific solvent enables the characterization of some types of contaminants, as in studies by Grifoll *et al.* (1990)) which related the mutagenic activity in sediments extracted by moderately polar solvents in the presence of compounds such as phthalic esters, aromatic amines and ketones, and substances such as nitro-PAHs, azaarenes and aromatic anhydrides extracted by polar solvents. Fernandez *et al.*, (1992) showed that the sediments extracted using solvents that were not highly polar or non-polar presented a higher number of compounds such as chlorinated pesticides and hepta and octachlorodibenzo-p-dioxins. These authors also showed that the origin of these compounds was the oxygenation of PAHs during combustion and or photo-oxidation of fossil materials and wood. He also revealed that other compounds with mutagenic activity extracted by moderately polar solvents, belong to the nitroarenes group and originate in the fuel combustion in cars. They are more active in the presence of external metabolic activation.

The mutagenic activity observed in this study did not present high indices, varying from 0.28 to 2.29 times the values observed in the negative control with responses that are only indicative of mutagenicity. The linear regression analysis (Myers *et al.*, 1991) allowed the estimation of values of 1.38 rev/ μ g of the extract.

According to Vargas *et al.* (1995), different chemical extraction processes do not preserve the volatile compounds present in the samples. In a study of water samples from the Caí river in an area under petrochemical influence, using a specific process to extract volatile compounds, they showed that these substances could be the main agents responsible for the mutagenic activity observed. Therefore, the low mutagenic activity observed in the sediments in this area may be related to this factor. Despite this, differences could be observed in the mutagenic activity between the upstream point and the stream mouth (figure 4.6), and at the latter it was more frequent in assays with metabolic activation. It should also be mentioned that different types of mutagenesis were found, indicating different contributions in the areas sampled.

Cytotoxicity proved to be the main marker of pollution for sediment samples in the area, showing an increasing gradient of responses as it approaches the industrial complex and the downstream area of the stream. This response was higher during the periods of the year with higher and lower mean temperatures, and was lower or absent when the weather was mild. Following up these analyses with chronic toxicity type assays has supplied responses that are complementary to this study, evidencing this action in *Daphnia magna*, in sediment samples from the same sites and collection dates (Felden *et al.*, 2002).

Therefore, it is clear that the stream is undergoing ecotoxicological degradation as the first area of impact of the petrochemical complex on the environment. Mutagenic and cytotoxic activity in sediment samples proved an important tool to determine the degradation of environmental quality. The chemical composition of this environmental matrix is complex and not fully understood, allowing multiple interactions between the biotic and abiotic components, generating synergistic, antagonistic and/or toxic effects. The *Salmonella*/microsome assay monitoring data at the molecular level served as a bioindicator, helping to determine impacts. This property of the assay and its use in areas with

environmental impact, allows the diagnosis of the presence of low concentrations of pollutants that cause mutagenesis and/or cytotoxicity, serving as an alert against environmental contamination and preventing damage to the genetic heritage of the fauna and flora affected by anthropic activity.

Acknowledgements

This research was supported by FEPAM, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), PADCT/FINEP 77.97.1116.00 (Programa de Apoio ao Desenvolvimento científico e Tecnológico/Financiadora de Estudos e Projetos) and Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

4.5. REFERENCES

- Bicckham., J. W., Sandhu, S., Hebert, P.D.N., Chikhi, L., Athwal, R. (2000) Effects of chemical contaminantes on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat. Res.*, **463**, 33-35.
- Bonnet, C., Babut, M., Férard, J.F., Martel, L. Garric., J. (2000) Assessing the potential toxicity of resuspended sediment. *Envir. Toxicol. Chem.*, 19,5, 1290 –1296.
- Cardozo, T., Ducatti, A., Vargas, V. M. F. (2001) Análise da atividade mutagênica de águas do arroio Bom Jardim em área de Influência Petroquímica no RS. *Anais do 5º Congresso de Ecologia do Brasil*, Porto Alegre, RS, Novembro, p. 386.
- Claxton, L., Houk, V.S., Hughes, T.J. (1998) Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res.*, **410**, 237-243.
- Ducatti, A., Mitelstaedt, A.B., Bringhenti, L., Vargas, V.M.F. (2001) Mutagenicity of airborne particulate samples in area of influence the petrochemical complex, Rio Grande do Sul State, Brazil. *Mutat. Res.*, **483**, S79.
- Grifoll, M., Solanas, A.M., Bayona, J.M. (1990). Characterization of genotoxic components in sediments by mass spectrometric techniques combined with Salmonella/microsome test. *Arch. Of Environm. Contam. And Toxicol.*, **19**, 175 – 184.
- Felden, I.R, Terra, N.R., Nunes, E.A. (2002). Exposição de D. magna para avaliação do sedimento do Arroio Bom Jardim entre junho 2001 e março 2002. 6º Encontro de Biólogos do Rio Grande do Sul. Porto Alegre RS Brasil, p.14.
- FEPAM. (1997) Métodos Analíticos de Avaliação Toxicológica da Qualidade Ambiental. Relatório de Pesquisa (Relatório Final - Subprojeto I), **III**.

- Fernández, P., Grifoll, M., Solannas, A.M., Bayona, J.M., Albagés, J. (1992) Bioassay-direct chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. *Environ. Sci. Technol.*, **26**, 817 – 829.
- Houk, V.S. (1992) The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review. Health Effects Research Laboratory, USEPA, *Mutat. Res.*, **277**, 91-138.
- Krumbein, W.C. (1934) Size frequency distribution of sediments. *Journal of Sed. Petrol.*, **4**, 65-77.
- Kado, N.Y., Guirguis, N., Guirguis, C., Flessel, P., Chan, R.C., Chang, K., Wesolowski, J.I. (1986) Mutagenicity of fine (< 2.5 µM) airborne particles: diurnal variation in community air determined by a Salmonella micro preincubation (microsuspension) procedure. *Environmental Mutagenesis*, **8**, 53-66.
- Loper, J.C. (1980) Mutagenic effects of organic compounds in drinking water. *Mutat. Res.*, **76**, 241-268.
- Maron, D.M., Ames, B.N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173-215,.
- McGeorge, L.J., Loius, J.B., Atherholt, T.B., McGarrit, G.J. (1983) Mutagenicity analyses of industrial effluents: background, results to date. *Report of the New Jersey Department of Environmental Protection*, Trenton, New Jersey.
- Meier, J.R. (1988) Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water. *Mutat. Res.*, **198**, 211-245.
- Myers, L.N., Adams, L., Kier, T.K., Rao, B., Shaw, B., Williams, L. (1991) Microcomputer software for data management and statistical analyses of the Ames/Salmonella test. In D. Krewski (ed.), *Statistical Methods in Toxicological Research*, Gordon and Brech, New York.

- Stahl, R.G.Jr. (1991) The genetic toxicology of organic compounds in natural waters and wastewaters. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **22**, 94-125.
- Stokes, G. G. (1851) On the effect of the internal friction of fluids on the motion of pendulums, *Trans. Cambridge Philos. Soc.*, **9**, 2, 8-106.
- USEPA. (1994) Assessment and Remediation of Contaminated Sediments (ARCS) Program, Assessment Guidance Document. EPA 905-B94-002. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- USEPA. (2000) Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second edition. EPA 600-R99-064, Duluth, MN.
- Valent, G.V. (1990) Avaliação da atividade mutagênica de extratos orgânicos de corpos d'água do Estado de São Paulo através de teste de Ames. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas, área de genética) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Vargas, V.M.F. (1992) Avaliação de testes para triagem e diagnóstico de agentes genotóxicos ambientais. Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, pp 237.
- Vargas, V.M.F., Guidobono, R.R., Jordão, C., Henriques, J.A.P. (1995) Use of two short-term tests to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration/extraction procedures. *Mutat. Res.*, **343**, 31-52.
- Vargas, V.M.F., Motta, V.E.P., Henriques, J.A.P. (1993) Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat. Res.*, **319**, 31-45.

- Vargas, V.M.F., Motta, V.E.P., Henriques, J.A.P. (1988) Analysis of mutagenicity of waters under the influence petrochemical industrial complexes by the Ames test (Salmonella / Microsome). *Rev. Bras. Genet.*, **11**, 3, 505-518.
- Vargas, V.M.F., Bresolin, S., Melo, A.C., Horn, R.C., Guidobono, R.R., Sá Ferreira, I.C. And Pestana, M.H. D. (2001b) Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutat. Res.*, **490**, 141-158.
- Vargas, V.M.F.; Ducatti, A. E Horn, R.C. (2001a) Diagnóstico de mutagênese ambiental e sua aplicabilidade em ecotoxicologia. Organizadores Tucci, C. E. M. E Marques, D. M. L. M. *Avaliação e controle da drenagem urbana* .Ed. ABRH – Porto Alegre- RS, **2**, pp 548.
- Vargas, V.M.F., Sarmiento, E.C., Rocha, J.A.V., Tagliari, K.C., Cardozo, T.R., Santos, C.A., Horn, R.C. (2003) Atividade mutagênica como medida de qualidade em bacias hidrográficas sujeitas a diferentes contribuições antrópicas. *Ecossistemas Aquáticos Costeiros e Continentais, VI CEB*, **1**, 448-490.
- Wentworth, C.K. (1922) A scale of grade and class terms for clastic sediments. *Journal of Geology*, **30**, 377-392.
- White, P.A, Rasmussen, B., Blaise, C. (1998) Genotoxic substances in the St. Lawrence system II: extracts of fish and macroinvertebrates from the St. Lawrence and Saguenay rivers, Canada. *Environm. Toxicol. and Chem.* **17**, 2, 304-316.



Figure 4.1: Location of the sampling points.RS – Rio Grande do Sul state; B.Jn, BJ002 and BJ000 – sampling points

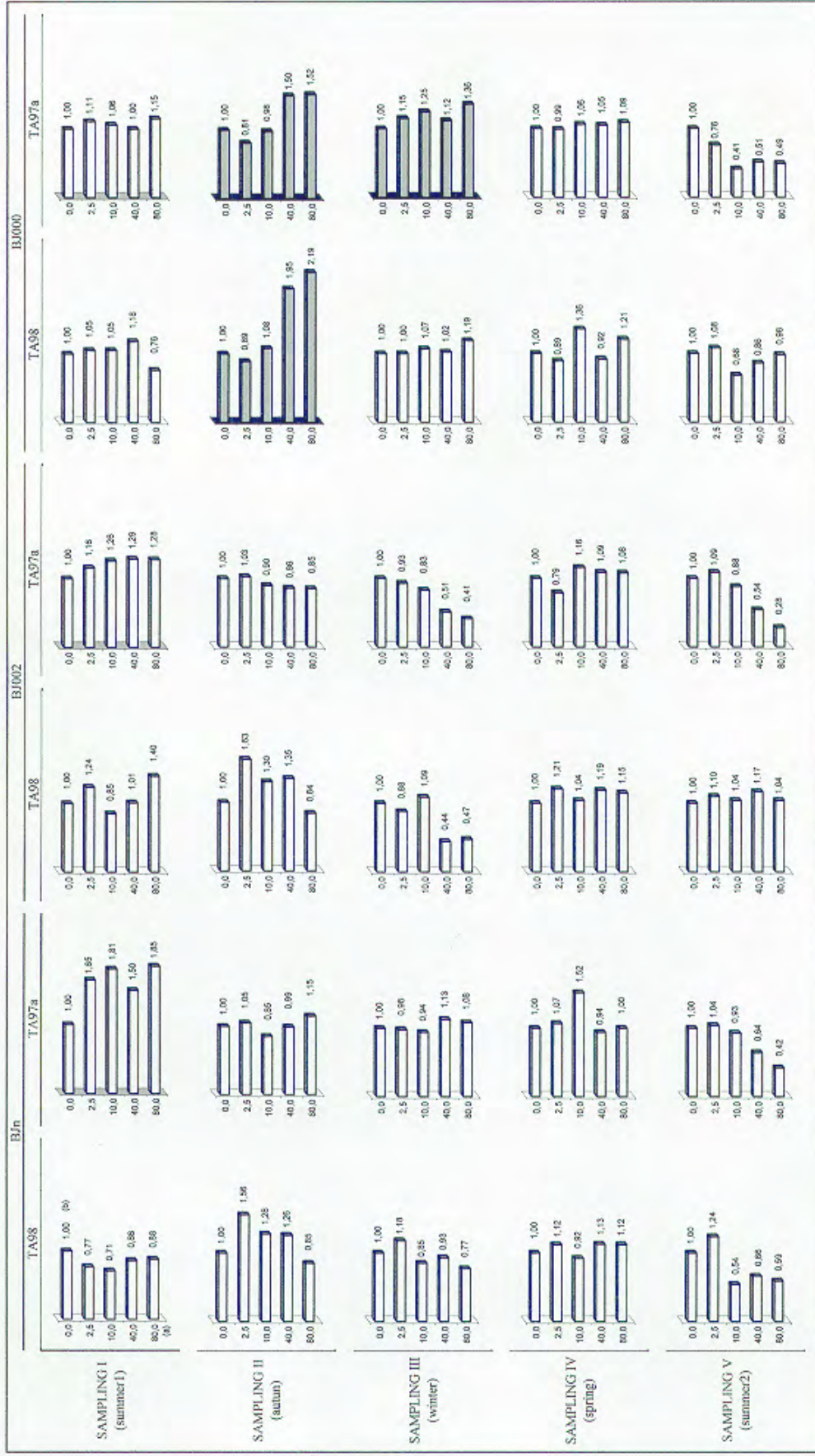


Figure 2. Mutagenic evaluation by microsuspension assay with frameshift strains (TA98 and TA97a) in the absence of metabolic activation. (a) Dose/plate (µg); (b) Mutagenic Index = No. revertants/plate of the sample per negative control revertants/plate; The graph floor indicates the regression analysis in the linear portion of the dose-response curve (f test significance) ; white columns = non significant; gray columns = p ≤ 0.5 and black columns = p ≤ 0.1 and the color of the columns represent final response: white = non-mutagenic, soft gray = indicative and black = positive.

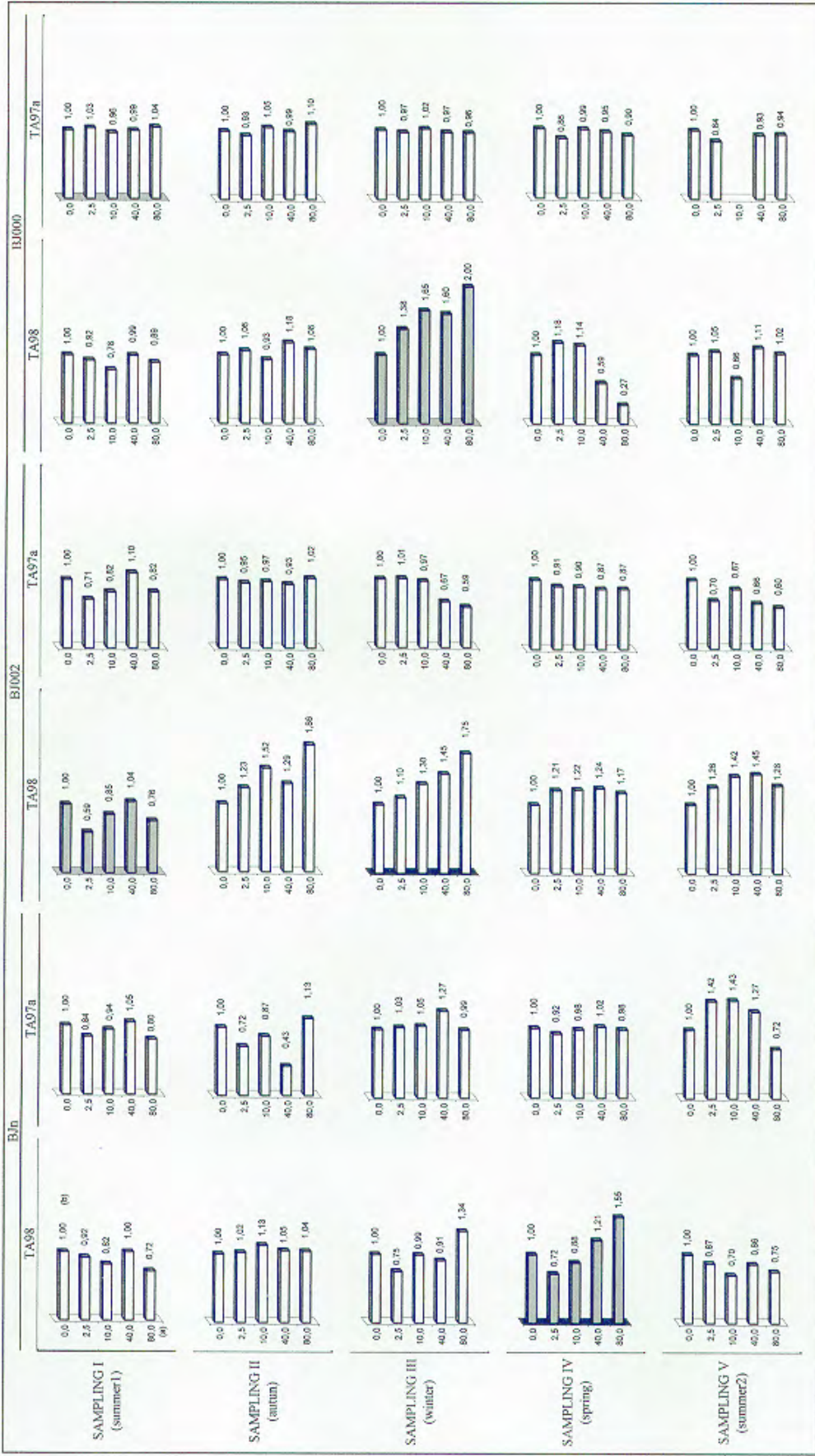


Figure 3: Mutagenic evaluation by microsuspension assay with frameshift strains (TA98 and TA97a) in the presence of metabolic activation. (a) Dose/plate (μg); (b) Mutagenic Index = No. revertants/plate of the sample per negative control revertants plate; The graph floor indicates the regression analysis in the linear portion of the dose-response curve (f test significance) : white columns = non significant; gray columns = $p \leq 0.5$ and black columns = $p \leq 0.1$ and the color of the columns represent final response: white = non-mutagenic, soft gray = indicative and black = positive.

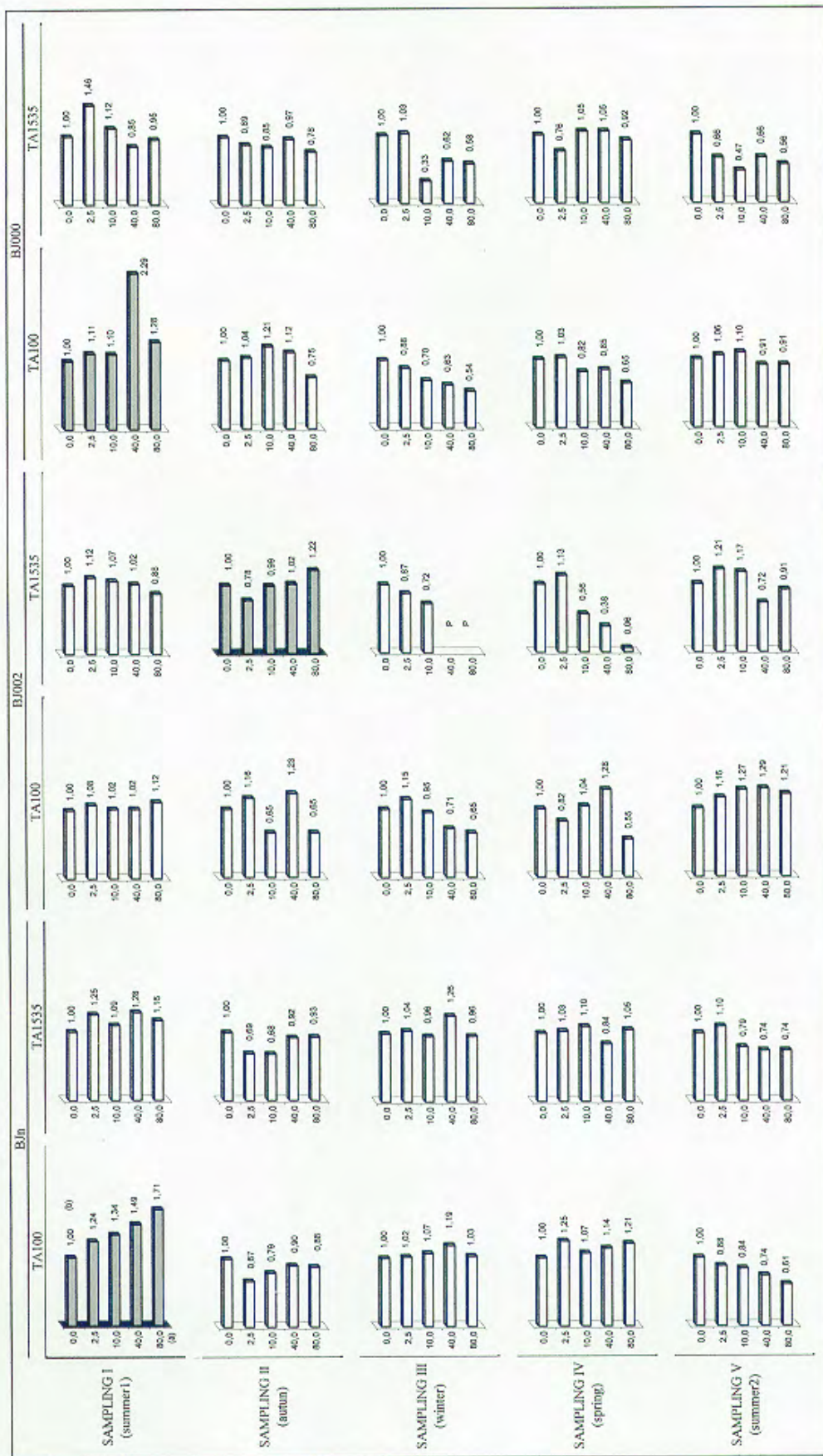


Figure 4: Mutagenic evaluation by micro-suspension assay with substitution base pair strains (TA100 and TA 1535) in the absence of metabolic activation. (a) Dose/plate (µg); (b) Mutagenic Index = No. revertants/plate of the sample per negative control revertants plate; The graph floor indicates the regression analysis in the linear portion of the dose-response curve (f test significance) : white columns = non significant; gray columns = p

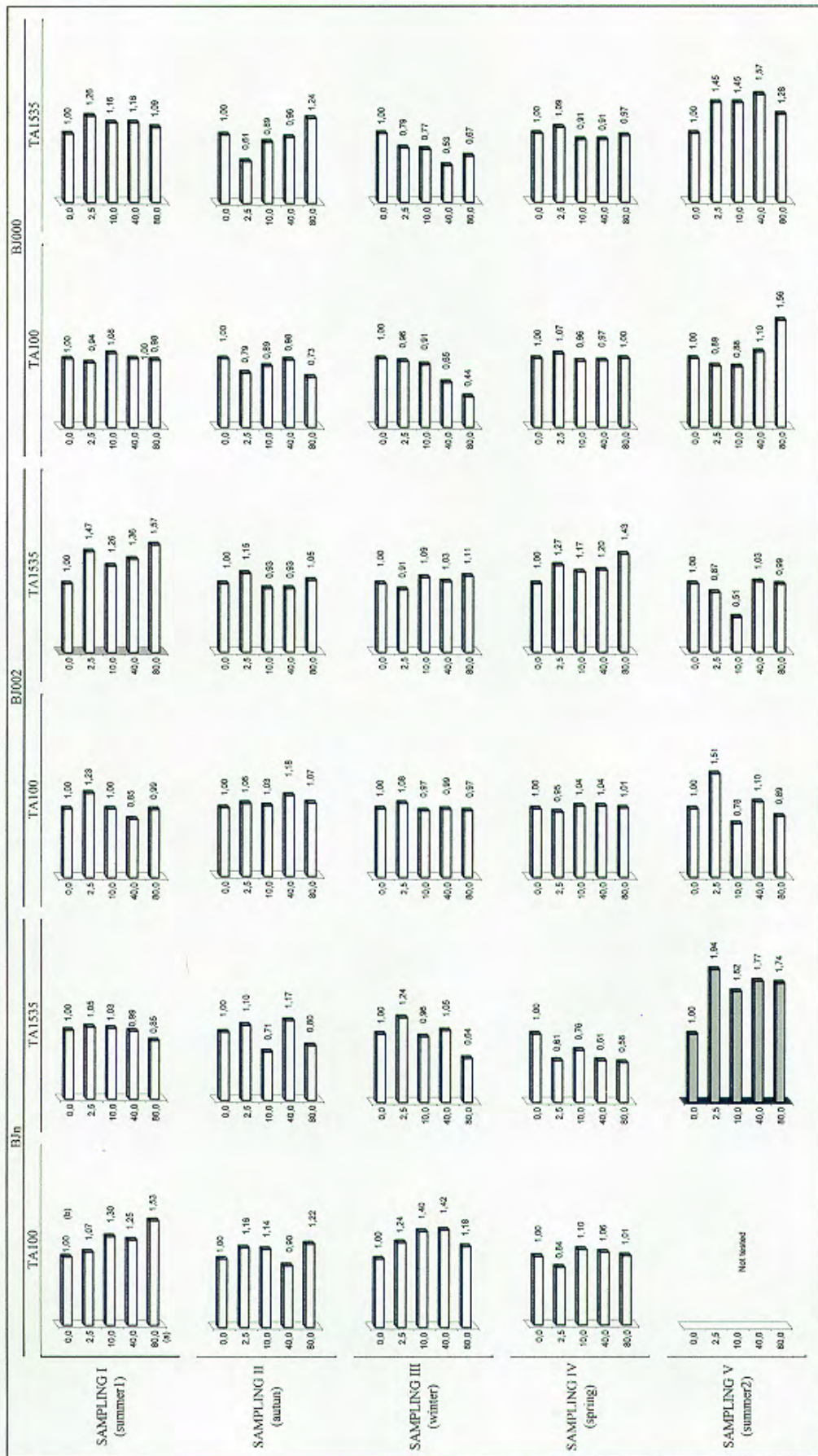


Figure 5: Mutagenic evaluation by microsuspension assay with substitution base pair strains (TA1000 and TA1535) in the presence of metabolic activation. (a) Dose/plate (µg); (b) Mutagenic Index = No. revertants/plate of the sample per negative control revertants plate; The graph floor indicates the regression analysis in the linear portion of the dose-response curve (f test significance) : white columns = non significant; gray columns = $p \leq 0.5$ and black columns = $p \leq 0.1$ and the color of the columns represent final response: white = non-mutagenic, soft gray = indicative and black = positive.

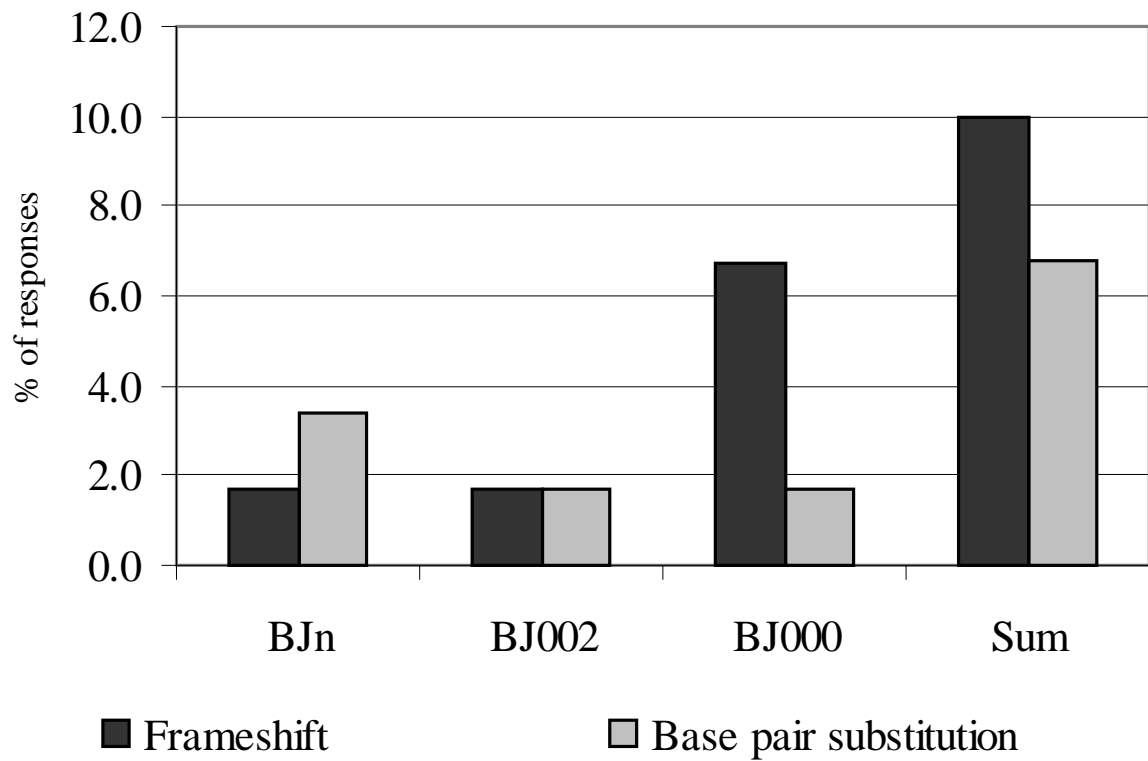


Figure 4.6: Mutagenic activity according to the types of damages observed in the DNA

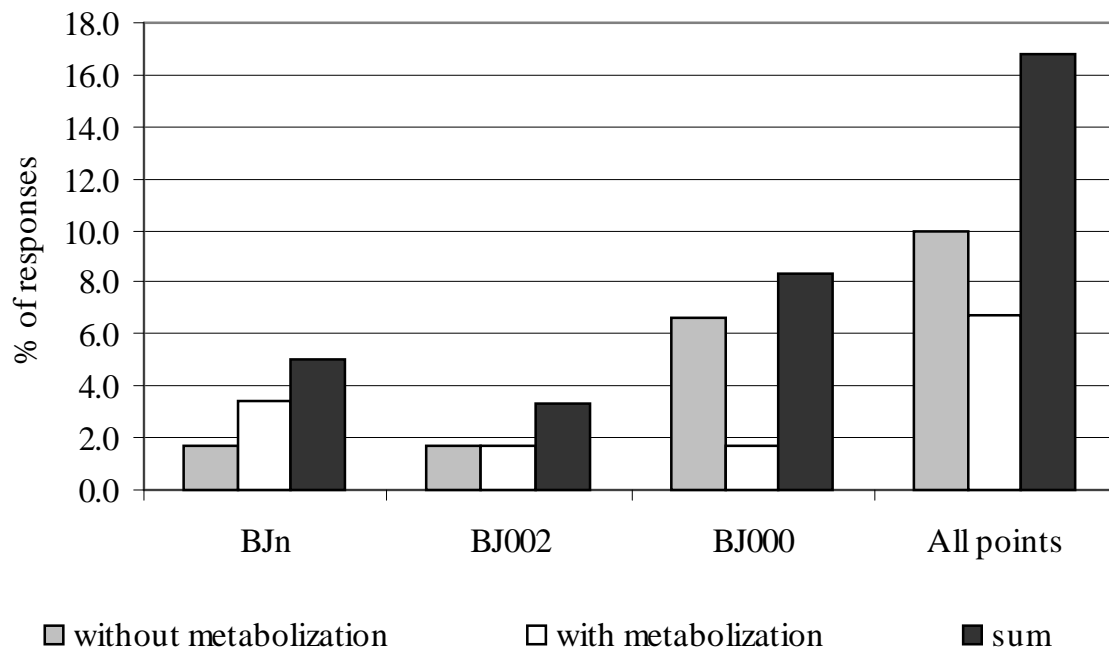


Figure 4.7: Mutagenic activity in different metabolic treatments

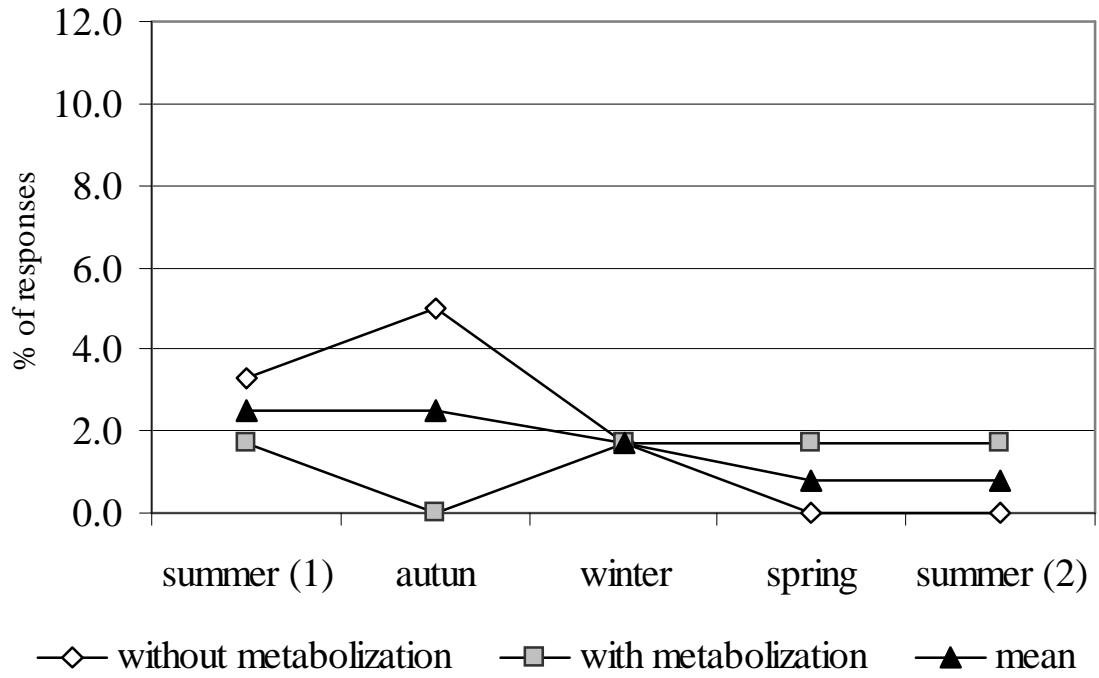


Figure 4.8: Mutagenic activity and its seasonal distribution

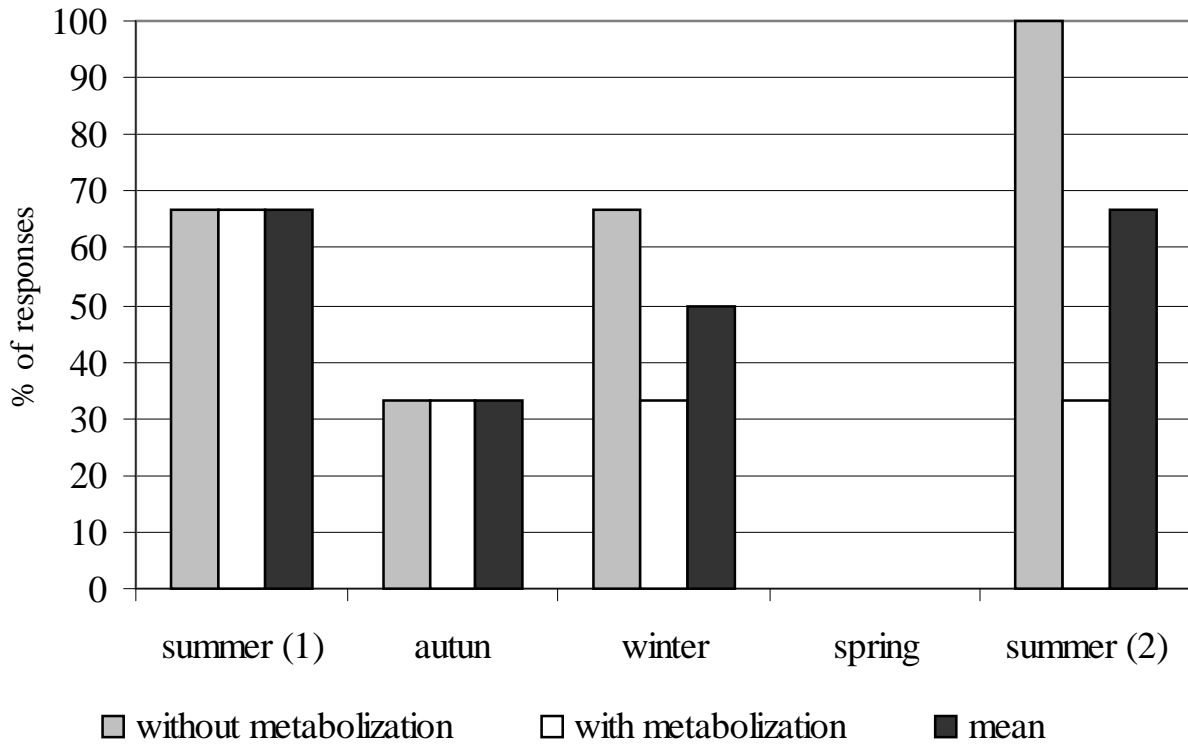


Figure 4.9: Results of cytotoxic activity (%) and its seasonal distribution.

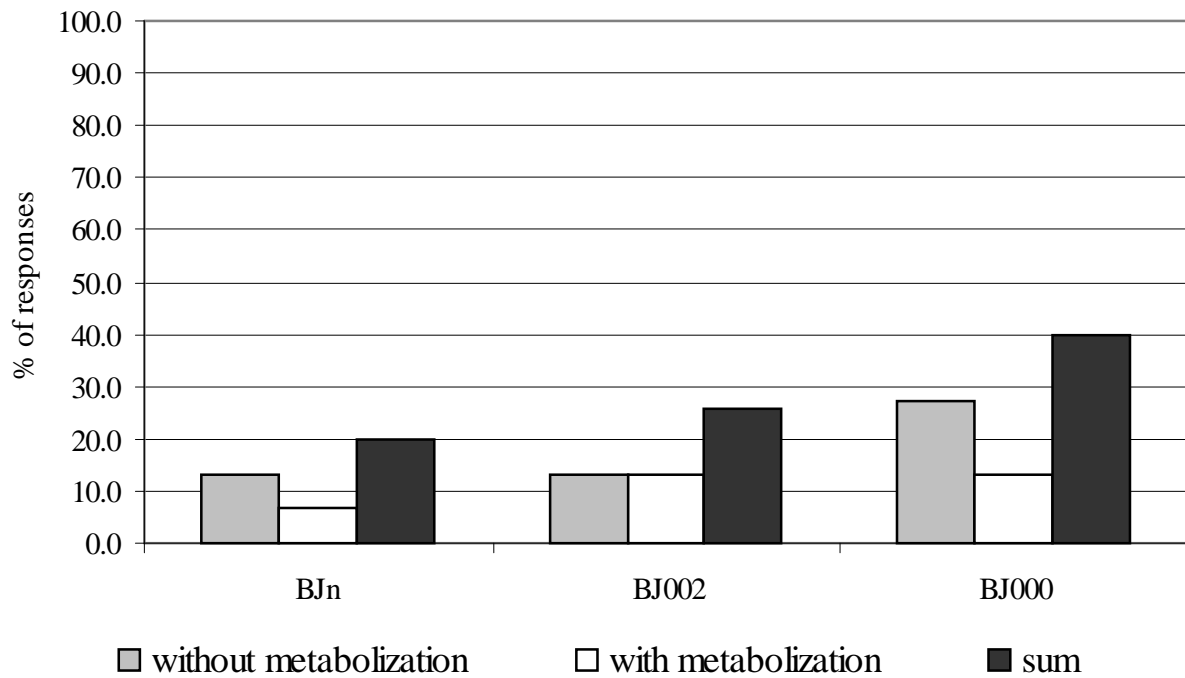


Figure 4.10: Results of cytotoxic activity (%) at different sampling points.

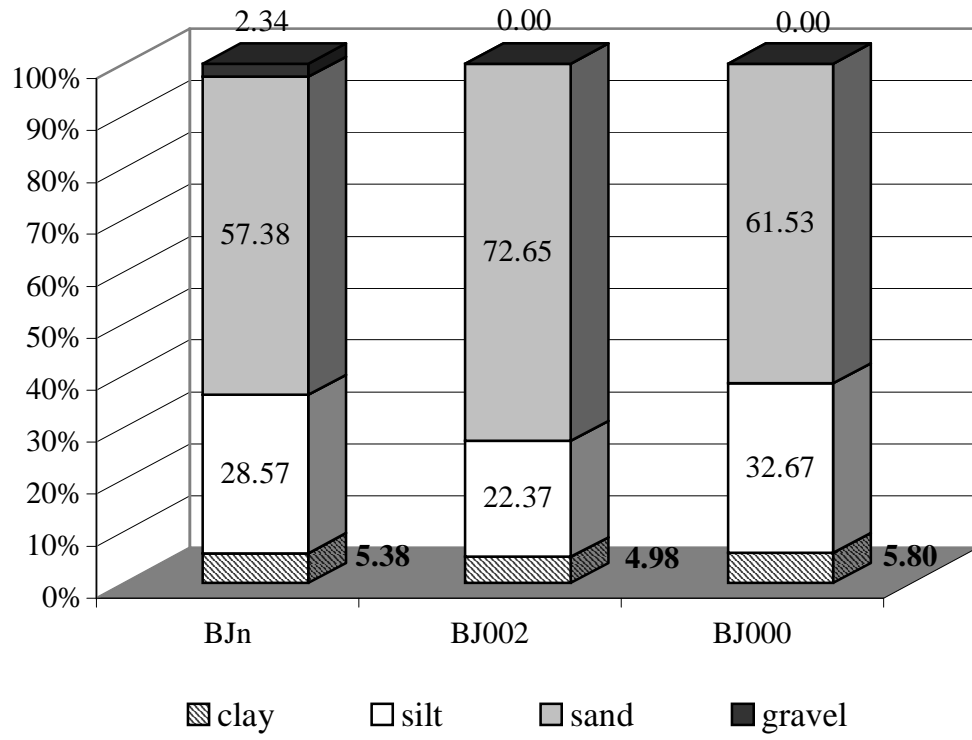


Figure 4.11: Results of grain size analysis.

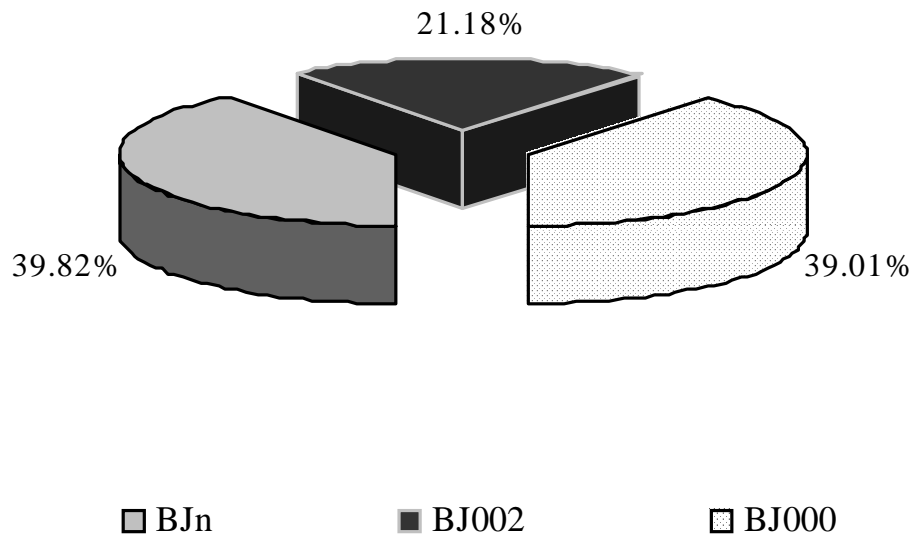


Figure 4.12: Results of wet sediment extraction.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Ao longo dos anos, foram realizados vários estudos de avaliação ecotoxicológica na área, sendo evidenciadas atividades tóxica crônica, genotóxica, mutagênica e citotóxica nos compartimentos ambientais aéreos e aquáticos (Vargas *et al.*, 1988; 1993; 1995; FEPAM 1997). O estudo atual mostrou a existência de atividade mutagênica baixa associada à elevada citotoxicidade no sedimento desta área, com maior resposta nas proximidades do Complexo Petroquímico. A atividade observada foi de natureza orgânica e originada por compostos moderadamente polares, causando danos principalmente do tipo erro no quadro de leitura. Foi observada variação sazonal tanto na atividade citotóxica (maior nos verões), quanto na ação mutagênica. A granulometria do sedimento mostrou uma maior presença de areias que resulta em acúmulo de diferentes substâncias no ambiente e influencia na intensidade da resposta biológica e na massa de material orgânico extraído. Portanto, o aspecto físico das amostras de sedimento é fator relevante para o diagnóstico da contaminação deste compartimento ambiental. O ensaio *Salmonella*/microsossoma, monitorando danos em nível molecular, serviu como bioindicador e auxiliou na determinação de impactos. Esta propriedade do ensaio permite diagnosticar a presença de baixas concentrações de poluentes que causam mutagênese e/ou citotoxicidade, servindo como alerta de contaminação ambiental. A elevada citotoxicidade observada pode afetar significativamente a comunidade aquática, sendo o indicativo mais efetivo na definição das áreas contaminadas neste estudo. No entanto, apesar dos baixos níveis de mutagenicidade, é importante a prevenção deste tipo de dano biológico de longo prazo. É importante salientar ainda, que estas amostras de sedimento apresentaram toxicidade crônica em *Daphnia magna* (Felden *et al.*, 2002) e amostras de água mostraram elevado percentual de respostas mutagênicas (Cardozo *et al.*, 2001). O acúmulo deste tipo de lesão é prejudicial aos ecossistemas naturais, podendo reduzir a sobrevivência de organismos,

influenciar na sua reprodução e nos seus padrões de adaptação, e alterar o patrimônio genético das populações expostas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(Referente ao texto da dissertação exceto o artigo)

AMES, B.N. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: **Chemical mutagens, principles methods for their detection**. New York: A. Hollaender, v. 1, p. 267-282, 1971.

APHA. Standart Methods For The Examination Of Water And Wastewater. **American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation**. 18th eds. M.A.H Franson, Washington, p 1-20, 1992.

BERSNSTEIN, L.; KALDOR, J.; McCANN, J.; PIKE, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data form the Salmonella test. **Mut. Res.**, v.97, n. 9, p.267-281, 1982.

BICCKHAM., J.W., SANDHU, S., HEBERT, P.D.N., CHIKHI, L., ATHWAL, R. Effects of chemical contaminantes on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mut. Res.**, v. 463, p. 33-5, 2000.

BROUWER, A., MURK, A.J., KOEMAN, J.H. Biochemical and physiological approaches in ecotoxicology. **Funct. Ecol.** v. 4, p. 275-281, 1990.

BURTON, G.A.Jr. Assessing the toxicity of freshwater sediments. **Environ. Toxicol. Chem.** v. 10, p. 1585-1627, 1991.

BURTON, G.A.Jr. Sediment toxicity assessment. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 457 p. 1992.

CANADÁ. Minister of National Health and Welfare and Minister of the Environment Advisory Committee on Mutagenesis. **Guidelines on the Use of Mutagenicity Tests in the toxicological Evaluation of Chemicals**, Ottawa, 84 p., 1986.

- CANTON, L., GRIMALT, J.O. Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in polluted coastal sediments. **J. Chromatogr.** v. 607, p. 279-286, 1992.
- CARDOZO, T., DUCATTI, A., VARGAS, V. M. F. Análise da atividade mutagênica de águas do arroio Bom Jardim em área de Influência Petroquímica no RS. **Anais do 5º Congresso de Ecologia do Brasil**, Porto Alegre, RS, Novembro, p. 386, 2001.
- CLAXTON, L. The developmant, validation, and analysis of Salmonella mutagenicity test methods for environmental situations. in: **Microscale testing in aquatic toxicology—advances, techniques, and practive**. Peter G.Welles, Kenneth Lee, Cristian Blaise edited, CRC Press LLC, 200, Florida, 1997.
- CLAXTON, L., HOUK, V.S., HUGHES, T.J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mut. Res.**, v. 410, p. 237-243, 1998.
- CLAXTON, L.D., ALLEN, J., AULETTA, A., MORTELMANS, K., NESTMANN, E., ZEIGER, E. Guide for the *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome tests for bacterial mutagenicity. **Mut. Res.**, v. 189, p. 83-91, 1987.
- CLAXTON, L.D., HOUK, V.S., MONTEITH, L.G., MYERS, L.E., HUGHES, T.J. Assessing the use of known mutagen to calibrate the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay: I. Without exagenous activation. **Mut. Res.**, v. 253, p. 47-137, 1991.
- CLAXTON, L., HOUK, V.S., GEORGE, S.E. Integration of complex mixture toxicity and microbiological analyses for environmental remediation research. In J. de Serres and A.D. Bloom (ed.), **Ecotoxicity and, human health: a biological approach to environmental remediation**, CRC Press Inc. 1995.
- CONNEL, D.W. Ecotoxicology - A Framework for investigations of hazardous chemicals in the environment. **Ambi**, v. 16, n. 1, p. 47-50, 1987.

DeMARINI, D.M., SHELTON, M.L., BELL, D.A. Mutation spectra in Salmonella of complex mixtures: Comparison of urban air to benzo[a]pyrene. **Environ. Mol. Mut.**, v. 24, p. 75-262, 1994.

DE RAAT, W.K., HANSTVEIT, A.O., De KREUK, J.F. The role of mutagenicity testing in the ecotoxicological evaluation of industrial discharges into the aquatic environment. **Food Chem. Toxicol.**, v. 23, p. 33-41, 1985.

DUCATTI, A., MITELSTAEDT, A.B., BRINGHENTI, L., VARGAS, V.M.F. Mutagenicity of airborne particulate samples in area of influence the petrochemical complex, Rio Grande do Sul State, Brazil. **Mut. Res.**, 483, S79, 2001

FDA. **Toxicological principles for the safety assessment of direct food additives and color additives used in food “Redbook II” [Draft]**. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Washington D.C., 1993.

FELDEN, I.R, TERRA, N.R., NUNES, E.A. Exposição de D. magna para avaliação do sedimento do Arroio Bom Jardim entre junho 2001 e março 2002. **6º Encontro de Biólogos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre RS Brasil, p.14, (2002).

FEPAM. **Métodos Analíticos de Avaliação Toxicológica da Qualidade Ambiental**. Relatório de Pesquisa. FEPAM/PADCT/FINEP, v. 3, 1997. (Relatório interno - Subprojeto I)

FEPAM. **Renovação de licença de operação do Sistema Integrado de Tratamentos de Efluentes Líquidos**. Processo nº 1103-0567/00-4, 2000.

FEPAM. **Estratégias Ecotoxicológicas de Avaliação de Risco**. FEPAM/PADCT/FINEP, 2002. (Relatório interno)

GATEHOUSE, D., HARWORTH, S., CEBULA, T., GOCKE, E., KIER, L., MATSUSHIMA, T., MELCION, C., NOHMI, T., OHTA, T., VENITT, S., ZEIGER, E.

- Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. **Mut. Res.**, v. 312, p. 217-233, 1994.
- GOGOÛ, A., BOULOÛASSI, I., STEPHANOÛ, E.G. Marine organic geochemistry of the Eastern Mediterranean: 1. Aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in Cretan Sea surficial sediments. **Mar. Chem.**, v. 68, p. 265-282, 2000.
- HENNER, P., SCHIAVON, M., MOREL, J.L., LICHTFOÛSE, È. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) occurrence and remediation methods. **Analysis Magazine**, v. 25, n. 9-10, p. M56-59, 1997.
- HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review. Health Effects Research Laboratory, USEPA, **Mut. Res.**, v. 277, p. 91-138, 1992.
- ICH. **Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals.** International Commission on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. International Commission on Harmonization, 1995.
- KADO, N.Y., GUIRGUIS, N., GUIRGUIS, C., FLESSEL, P., CHAN, R.C., CHANG, K., WESOLOWSKI, J.I. Mutagenicity of fine (< 2.5 µM) airborne particles: diurnal variation in community air determined by a Salmonella micro preincubation (microsuspension) procedure. **Environm. Mutagen.**, v. 8, p. 53-66, 1986.
- KEMP, P.F., SWARTZ, R.C. Acute toxicity of interstitial and particle-bound cadmium to a marine infaunal amphipod. **Marine Environ. Res.**, v. 26, p.135-153, 1988.
- KNEZOVICH, J.P, HARRISON, F.L., WILHELM, R.G. The bioavailability of sediment-sorbed organic chemicals: A review. *Water Air Soil Pollut.*, v. 32, p. 233-245, 1987.
- KOWALESKA, G., KONAT, J. Distribution of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of the southern Baltic Sea. **Oceanologia**, v. 39, n. 1, p. 83-104, 1997.

- KRUMBEIN, W.C. Size frequency distribution of sediments. **J. of Sed. Petrol.**, v. 4, p. 65-77, 1934.
- LAMBERSON, J.O., SWARTZ, R.C. Spiked sediment toxicity test approach. Chapter 4. In: **Sediment Classification Methods Compendium**. EPA-823/R-92-006. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. 1992.
- LEMOS, C.T., VARGAS, V.M.F., HENRIQUES, J.A.P., MATTEVI, M.S. Genotoxicity of river water under the influence of Petrochemical Industrial Complexes. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 52. p. 848-855, 1994.
- LOPER, J.C. Mutagenic effects of organic compounds in drinking water. **Mut. Res.**, v. 76, p. 241-268, 1980.
- MAGI, E., BIANCO, R., IANNI, C., Di CARRO, M. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of Adriatic Sea. **Environm. Poll.** V. 119, p. 91-98, 2002.
- MARON, D.M., AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mut. Res.**, v. 113, p. 173-215, 1983.
- MARTINS, M.T., SANCHEZ, P.S., SATO, M.I.Z., GAGLIANONE, S. Detecção de substâncias mutagênicas em águas - resultados preliminares. In: **VI Simpósio Anual de ACIESP**, São Paulo. Anais, São Paulo: ACIESP, 3: 114-119, 1982.
- McGEORGE, L.J., LOIUS, J.B., ATHERHOLT, T.B., McGARRIT, G.J. Mutagenicity analyses of industrial effluents: background, results to date. **Report of the New Jersey Department of Environmental Protection**, Trenton, New Jersey. 1983.
- MEIER, J.R. Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water. **Mut. Res.**, v. 198, p. 211-245. 1988.
- MIGUEL, A.G., DAISEY, J.M., SOUZA, J.A. Comparative study of the mutagenic and genotoxic activity associated with inhalable particulate matter in Rio de Janeiro. **Air. Environ. and Mol. Mutagenesis**, v. 15, p. 36-43, 1990.

MORTELMANS, K., ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay.

Mut. Res., v. 455, p. 29-60. 2000.

MYERS, L.N., ADAMS, L., KIER, T.K., RAO, B., SHAW, B., WILLIAMS, L.

Microcomputer software for data management and statistical analyses of the Ames/Salmonella test. In D. Krewski (ed.), **Statistical Methods in Toxicological Research**, Gordon and Brech, New York, 1991.

OECD. Guideline for Testing of Chemicals, Test Guideline 471: **Bacterial Reverse Mutation Test**, OECD, Paris, France, 1997.

RIO GRANDE DO SUL. Lei Ordinária N° 7.691, Dispõe sobre os efluentes do Pólo Petroquímico do Sul, Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 7 de julho de 1982.

ROSENKRANZ, H.S. Mutagenic nitroarenes, diesel emissions, particulate-induced mutations and cancer: an assay on cancer-causation by a moving target. **Mut. Res.**, v. 367, p. 65-72, 1996.

SAMOIOFF, M.R., BELL, J., BIRKHOLZ, D.A., WEBSTER, G.R.B., ARNOFF, E.G., PULAK, R., MADRID, A. Combined bioassay-chemical fractionation scheme for the determination and ranking of toxic chemicals in sediments. **Environ. Sci. Technol.** v. 17, p. 329-334, 1983.

SANCHEZ, P.S., SATO, M.I.Z., PASCHOAL, C.M.R.B., ALVES, M.N., FURLAN, E., MARTINS, M.T. Toxicity assessment of industrial effluents from São Paulo State, Brazil, using short - term microbial assays. **Toxicity Assessment**, v. 3, p. 55-80, 1988.

SATO, M.I.Z., VALENT, G.U., COIMBRÃO, C.A., COELHO, M.C.L.S., SANCHEZ, P.S., ALONSO, C.D., MARTINS, M.T. Mutagenicity of airborne particulate organic material from urban and industrial areas of São Paulo, Brazil. **Mut. Res.**, v. 335, p. 317-330, 1995.

SINGH, A.K., SPASSOVA, D., WHITE, T. Quantitative analysis of polychlorinated biphenyls, organochlorine insecticides, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated hydrocarbons and polynitrohydrocarbons in spiked samples of soil, water and plasma by selected ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatog.**, v. B706, p. 231-244, 1998.

STAHL, R.G.Jr. The genetic toxicology of organic compounds in natural waters and wastewaters. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v. 22, p. 94-125, 1991.

STEMMER, B.L., BURTON, G.A.JR., SASSON-BRICKSON, G. Effect of sediment spatial variance and collection method on cladoceran toxicity and indigenous microbial activity determinations. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 9, p. 1035-1044, 1990.

STOKES, G. G. On the effect of the internal friction of fluids on the motion of pendulums. **Trans. Cambridge Philos. Soc.**, v. 9, n. 2, p 8-106, 1851.

UKEMS. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, **Report of UKEMS Guidelines, Part III**, Edited by D J Kirkland, Cambridge University Press, 1989.

UKEMS. Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures, **Report of UKEMS Guidelines, Part I Revised**, Edited by D J Kirkland, Cambridge University Press, 1990.

UKEMS. Supplementary Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures, **Report of UKEMS Guidelines, Part II Revised**, Edited by D J Kirkland, Cambridge University Press, 1992.

USEPA. **Guidelines for preparing environmental and waste samples for mutagenicity (Ames) testing: Interim Procedures and Panel Meeting proceedings. EPA 600/07/68-03-3136**, U.S. Environmental Protection Agency, Sept., Las Vegas, p.225, 1985.

USEPA. **Assessment and Remediation of Contaminated Sediments (ARCS) Program, Assessment Guidance Document. EPA 905-B-94-002**. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. 1994

USEPA. **Methods for collection, storage and manipulation of sediments for chemical and toxicological analyses: technical manual.** EPA 823-B-01-002. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. 2001.

USEPA-USACOE. Ecological evaluation of proposed discharge of dredged material into ocean waters. Technical Committee on Criteria for Dredged and Fill Material. U.S. Army Engineer Waterways Experiment Station, Environmental Effects Laboratory, Vicksburg, MS. 1977.

VALENT, G.V. **Avaliação da atividade mutagênica de extratos orgânicos de corpos d'água do Estado de São Paulo através de teste de Ames.** (Tese de Doutorado - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas), 1990.

VAN COILLIE, R., BERMINGHAM, N., BLAISE, C., LAKSHMINARAYANA, J.S.S. Integrated ecotoxicological evaluation of effluents from dump-sites. **Adv. Environ. Sci.**, v. 22, p. 161-191, 1989.

VARGAS, V.M.F. **Avaliação de testes para triagem e diagnóstico de agentes genotóxicos ambientais.** (Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, 237p., 1992.

VARGAS, V.M.F., MOTTA, V.E.P., HENRIQUES, J.A.P. Analysis of mutagenicity of waters under the influence petrochemical industrial complexes by the Ames test (Salmonella / Microsome). **Rev. Bras. Genet.**, v. 11, n. 3, p. 505-518, 1988.

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

VARGAS, V.M.F., GUIDOBONO, R.R., JORDÃO, C., HENRIQUES, J.A.P. Use of two short-term tests to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration/ extraction procedures. **Mut. Res.**, v. 343, p. 31-52, 1995.

- VARGAS, V.M.F., HORN, R.C., GUIDOBONO, R.R., MITTELSTAEDT, A.B., AZEVEDO, I.G. Mutagenic activity of airborne particulate matter from urban areas of Porto Alegre, Brazil. **Genet. Mol. Biol.**, v. 21, n. 2, p. 247-253, 1998.
- VARGAS, V.M.F., BRESOLIN, S., MELO, A.C., HORN, R.C., GUIDOBONO, R.R., SÁ FERREIRA, I.C. and PESTANA, M.H. D. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. **Mut. Res.**, v. 490, p. 141-158, 2001a.
- VARGAS, V.M.F.; DUCATTI, A. e HORN, R.C. Diagnóstico de mutagênese ambiental e sua aplicabilidade em ecotoxicologia. Organizadores TUCCI, C. E. M. e MARQUES, D. M. L. M. **Avaliação e controle da drenagem urbana**. Ed. ABRH – Porto Alegre-RS, v. 2, p. 548, 2001b
- VARGAS, V.M.F., SARMENTO, E.C., ROCHA, J.A.V., TAGLIARI, K.C., CARDOZO, T.R., SANTOS, C.A., HORN, R.C. Atividade mutagênica como medida de qualidade em bacias hidrográficas sujeitas a diferentes contribuições antrópicas. **Ecosistemas Aquáticos Costeiros e Continentais, VI CEB**, v.1, 448-490, 2003.
- WEISBURGER, J.H. Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now. **Mut. Res.**, v. 437, p. 105-112, 1999.
- WENTWORT, C.K. A scale of grade and class terms for clastic sediments. **Journal of Geology**, v. 30, p. 377-392, 1922.
- WHITE, P.A., RASMUSSEN, J.B., BLAISE, C. Comparing the presence, potency, and potential hazard of genotoxins extracted from a broad range of industrial effluents. **Environ. Mol. Mutag.**, v. 27, p. 116-139, 1996.
- WHITE, P.A., RASMUSSEN, B., BLAISE, C. Genotoxic substances in the St. Lawrence system II: extracts of fish and macroinvertebrates from the St. Lawrence and Saguenay rivers, Canada. **Environm. Toxicol. and Chem.** v. 17, n. 2, p. 304-316, 1998.

ANEXOS

Mutagenesis

Information for Authors

Scope and policy of Mutagenesis

Mutagenesis is an international multi-disciplinary journal designed to bring together research aimed at the identification, characterization and elucidation of the mechanisms of action of physical, chemical and biological agents capable of producing genetic change in living organisms and the study of the consequences of such changes.

A variety of different types of manuscripts are published in *Mutagenesis*:

Original articles, reporting the results of fundamental and molecular studies upon the mechanisms of induction of point, chromosomal and genomic mutations and their roles in inherited and somatic disorders.

Papers on guidelines for mutagenicity testing of environmental agents, which describe and discuss the techniques and quality control standards necessary for adequate testing of environmental agents.

The results and conclusions of mutagenicity testing programmes. Authors wishing to publish the results of extensive testing programmes are invited to submit their complete laboratory data for inclusion in the Database Section of *Mutagenesis*. The conclusions of such studies are published in summary form in the Journal and copies of laboratory data for specific agents may be obtained directly from the Publisher, quoting Journal reference, test system and test agent. Authors wishing to publish their data in this section should consult the paper by Brooks, T.M., Meyer, A.L. and Hutson, D.H. (1988) The genetic toxicology of some hydrocarbon and oxygenated solvents. *Mutagenesis*, **3**, 227-232, for an example of the appropriate format.

Cell lines, strains, DNA probes etc. The submission to and acceptance of a manuscript for publication in *Mutagenesis* implies that the authors will provide samples of such materials as cell lines, strains, mutants and DNA probes described in their publication to other investigators for research purposes.

Animal husbandry. Papers that report experiments involving live animals must include a statement that the animals were treated and housed in accordance with approved guidelines (giving the source) or supervised by an animal care committee (giving the name) or both.

Letters to the Editors may be submitted on current topics. Such letters may cover theoretical, social and practical aspects of mutational change, but should aim for a concise presentation.

Reviews The Editors welcome the submission of reviews of topics covering all aspects of mutagenic change.

All manuscripts submitted to *Mutagenesis* are refereed for their pertinence, content and relevance to the scope of the journal.

Submission of manuscripts

The manuscript (the original and three copies), together with a signed conflict of interest form <http://www3.oup.co.uk/mutage/instauth/mutacon.pdf> from each author, should be submitted directly to the appropriate Executive Editor

For the American Continent: Dr J L Schwartz, University of Washington Medical Center, Radiation Biology Laboratory, 1959 NE Pacific, Seattle, WA 98195-6069, USA

For Japan: Dr M.Hayashi, Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.

For Europe and the Rest of the World: Prof. D H Phillips, Institute of Cancer Research, Brookes Lawley Building, Cotswold Road, Sutton, Surrey, SM2 5NG, UK.

Submission of a paper implies that it reports unpublished work and that it is not under consideration for publication elsewhere. If previously published tables, illustrations or more than 200 words of text are to be included, then the copyright holder's written permission must be obtained. Copies of any such permission letters should be enclosed with the paper.

The final revised version of the manuscript should be returned to the editor on floppy disk. Whilst the publishers can accept most computer and word processor disks, the preferred combinations are either PC MS-DOS, PC WINDOWS or APPLEMAC, and either Microsoft Word or WordPerfect. It is important to note that the disk MUST be accompanied by two hard copy printouts of the revised manuscript and a completed disk submittal form. (Please note that disk submission is not necessary prior to revision.)

Proofs

Authors are sent page proofs electronically as a PDF file, or by post if required. To avoid delays in publication, proofs should be checked immediately for typographical errors and returned to the publishers by express (special delivery) post. Alternatively, to save time, corrections may be given to Oxford University Press by fax (01865 353773). Essential changes of an extensive nature may be made only by insertion of a Note added in proof. A charge is made to authors who insist on amendment within the text at the page-proof stage.

Licence to publish

It is a condition of publication in the Journal that authors grant an exclusive licence to UK Environmental Mutagen Society. This ensures that requests from third parties to reproduce articles are handled efficiently and consistently and will also allow the article to be as widely disseminated as possible. Authors may use their own material in other publications provided that the Journal is acknowledged as the original place of publication, and Oxford University Press is notified in writing and in advance.

Preparation of manuscripts

Manuscripts should be in their final form when they are submitted so that proofs require only correction of typographical errors.

Sections of the manuscript

Regular full-length papers should be subdivided into the following sequence of sections: Title page, Abstract, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Legends to figures, Tables. The Title page must include the telephone and fax numbers and E-mail address of the corresponding author. In the

Journal, the Materials and methods, Acknowledgements and References sections are printed in smaller type to accommodate more text. The Materials and methods section must give precise details of strains, concentrations and solvents. Where an activation system has been included it is necessary to know (i) the source, (ii) the inducer and (iii) the concentration treatment time, and incubation time with conditions should be given. Positive and negative controls together with their concentrations must be included. The number of replicates and the number of repeat experiments should be stated. Additional factors for *in vivo* tests should include age, weight, sex and total number of animals used in each experiment. A detailed dose regime is required. Papers for the Mutagenicity testing section should conform to the above requirements. In addition, results should be presented in tabular form.

General format

Manuscripts should be legibly typed on A4 or American quarto paper. All sections of the manuscript must be double-spaced (space between the lines of type not less than 6 mm). Margins of 25 mm (1 inch) should be left at the sides, top and bottom of each page. Number each page top right (Title page is 1). Please avoid footnotes; use instead, and as sparingly as possible, parenthesis within brackets. Underline only words or letters to appear in italics. Clearly identify unusual or handwritten symbols and Greek letters. Differentiate between the letter O and zero, and the letters I and l and number 1. Mark the position of each figure and table in the margin.

Abstract

The second page of every manuscript must contain only the Abstract, which should be a single paragraph not exceeding 300 words. Please abide strictly by this limitation of length. Published papers will only have the first 300 words of their abstracts incorporated into Medline, text in excess of this limit will be lost. The Abstract should be comprehensible to readers *before* they have read the paper, and abbreviations and reference citations should be avoided.

Acknowledgements

These should be included at the end of the text and not in footnotes. Personal acknowledgements should precede those of institutions or agencies.

References

Authors are responsible for the accuracy of the references. Published articles and those in press (state the journal which has accepted them) may be included. In the text a reference should be cited by author and date; not more than two authors may be cited per reference; if there are more than two authors use *et al.* At the end of the manuscript the citations should be typed in alphabetical order with the authors surnames and initials inverted. References should include, in the following order: authors' names, year, paper title in full, journal title, name and address of publisher (books only), volume number and inclusive page numbers. The name of the journal should be abbreviated according to the *World List of Scientific Periodicals* and underlined to indicate italics.

References should therefore be listed as follows:

Hartley-Asp,B. and Hyldig-Nielsen,F. (1984) Comparative genotoxicity of nitrogen mustard and nor-nitrogen mustard. *Carcinogenesis*, **5**, 1637-1640.

Kirk,J.T.O. and Tilney-Bassett,R.A.E. (1978) *The Plastids. Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance*, 2nd revised edn. Elsevier/North Holland, New York.

Warren,W. (1984) The analysis of alkylated DNA by high pressure liquid chromatography. In Venitt,S. and Parry,J.M. (eds), *Mutagenicity Testing - a Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp. 25-44.

Personal communication (J.Smith, personal communication) should be authorized by those involved, in writing, and unpublished data should be cited as (unpublished data). Both should be used as sparingly as possible and only when the unpublished data referred to is peripheral rather than central to the discussion. References to manuscripts in preparation or submitted, but not yet accepted, should be cited in the text as (B.Smith and N.Jones, in preparation) and should NOT be included in the list of references.

Tables

Tables should be typed on separate sheets, and numbered consecutively with Roman numerals. Tables should be self-explanatory and include a brief descriptive title.

Footnotes to tables indicated by lower case letters are acceptable, but they should not include extensive experimental detail. An arrow in the text margin should be used to indicate where a table should be inserted in the text.

Illustrations

All illustrations (line drawings and photographs) should be referred to in the text as Figure 1 etc., which should be abbreviated to 'Fig. 1.' only in the figure legend. Write the title of your paper, the name of the first author and the figure number lightly in blue pencil on the back of each figure. On the back also indicate clearly the top margin of each figure. On the manuscript indicate with an arrow in the margin the most appropriate position for the figure.

Photographs. These must be submitted in the desired final size so that reduction can be avoided. The type area of a page is 248 x 185 mm (width) and photographs, including their legends, must not exceed this area. A single column is 88 mm wide. A double column is 185 mm wide. Ideally, photographs should fit either a single column or a double column. Photographs should be of sufficiently high quality with respect to detail, contrast and fineness of grain to withstand the inevitable loss of contrast and detail inherent in the printing process. Please indicate the magnification by a rule on the photographs.

Colour plates. There is a special charge for the inclusion of colour plates. The cost is £600 *per plate*. (For cost purposes, the definition of a single figure is artwork that can be processed as a unit and printed on a single page without intervening type. Authors should note the potential cost savings inherent in this definition; for example, two consecutive half-page colour figures mounted as a composite and printed on one page, with both legends below or on the facing page, would be treated as one figure.)

Line drawings. Please provide these as clear, sharp prints, suitable for reproduction as submitted. No additional artwork, redrawing or typesetting is done. Therefore, all labelling should preferably be made with a lettering set. Ensure that the size of lettering is in proportion with the overall dimensions of the drawing. Ideally, line drawings should be submitted in the desired final size to avoid reduction (maximum dimensions 248 x 185 mm including legends) and should fit either a single (88 mm) or a double column width (185 mm). If submitting line drawings which require reduction, please check that the lettering will be clearly legible after the drawing has been reduced to the size at which it will be printed. After reduction, letters should not be smaller than 1.5 mm in height.

Figure legends. These should be on a separate, numbered manuscript sheet. Define all symbols and abbreviations used in the figure. Common abbreviations and others in the preceding text should not be redefined in the legend.

Conventions

In general, the journal follows the conventions of the *CBE Style Manual* (Council of Biology Editors, Bethesda, MD, 1983, 5th edn).

Follow *Chemical Abstracts* and its indexes for chemical names. For guidance in the use of biochemical terminology follow the recommendations issued by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, as given in *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, published by the Biochemical Society, UK. For enzymes, use the recommended name assigned by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1978, as given in *Enzyme Nomenclature*, published by Academic Press, New York, 1980. Where possible, use the recommended SI (Système International) units.

Genotypes should be italicized; phenotypes should not be italicized. For bacterial genetics nomenclature follow Demerec *et al.* (1966) *Genetics*, **54**, 61-76.

Abbreviations

Try to restrict the use of abbreviations to SI symbols and those recommended by the IUPAC. Abbreviations should be defined in brackets after their first mention in the text. Standard units of measurements and chemical symbols of elements may be used without definition in the body of the paper.

Reprints

The publishers supply 30 reprints gratis or free URL. Reprint order forms are sent out with the proofs, and must be completed and returned with the proofs to Oxford University Press. Late orders submitted after the journal is printed are subject to increased prices.

Copyright © [United Kingdom Environmental Mutagen Society](#) 2004
Print ISSN: 0267-8357 Online ISSN: 1464-3804.
[Oxford University Press Privacy Policy and Legal Statement](#)

ANEXO II: Saída do software SALMONEL.

Source/Batch/Lot: SEDIMENTO
Solvent: DMSO
Record No.: 4 Exp. Date: 07/27/01 Exp. No.: 12/01 Technician: RCH
Assay Type: Preincubation. EXTRACAO POR DCM GRAU PESTICIDA
Strain: TA97a Activation S9: -
Data File Name: C:\SALMONEL\pader3\sediment\coleta3\ta97a

Code Dose	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted Linear	
0.00	155	163	146	160	156.00	7.44	165.84
2.50	138	171			179.50	12.02	167.18
10.00	199	191			195.00	5.66**	171.18
40.00	183	168			175.50	10.61	187.21
80.00	239	186			212.50	37.48	208.58

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

S: Negative control for use in analysis (solvent control)
P: Positive control not used in analysis
P-value for ANOVA test of dose response is 0.029
An acceptable model is Linear with pval = 0.100
Press ESC to quit; any other key to continue

Salmonella Assay

Record No.: 4 Experiment Date: 07/27/01 Experiment No.: 12/01
Test Sample Name: TA97a - HJ000 (Ensaio de microssuspensao/extrato)
Tester Strain: TA97a

Estimate of the slope is = 0.534278 .
Standard error of the slope is = 0.157210 .
90% confidence limits for the slope are <0.236434, 0.832122>.

P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is 0.006

Note: Smaller P-value means more positive dose response

Press ESC to quit; any other key to continue