UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de pós-graduação em Farmácia
Áreas de Toxicologia e Análises Toxicológicas

**BLUE RAYON COMO ALTERNATIVA PARA EXTRAÇÃO DE
COMPOSTOS ORGÂNICOS GENOTÓXICOS PRESENTES EM
AMOSTRAS DE ÁGUAS**

Fábio Kummrow

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro

São Paulo
2001

17.031

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004439

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

K96b Kummrow, Fábio
Blue rayon como alternativa para extração de compostos
orgânicos genotóxicos presentes em amostras de águas / Fábio
Kummrow. -- São Paulo, 2001.
103p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador : Umbuzeiro, Gisela de Aragão

I. Toxicologia ambiental I. T. II. Umbuzeiro, Gisela de
Aragão, orientador.

615.9 CDD

FÁBIO KUMMROW

**BLUE RAYON COMO ALTERNATIVA PARA EXTRAÇÃO DE
COMPOSTOS ORGÂNICOS GENOTÓXICOS PRESENTES EM
AMOSTRAS DE ÁGUAS**

COMISSÃO JULGADORA DA
DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro
Orientadora: Presidente

Dr. Paolo Di Mascio

1º Examinador

Dra. Nilda Alicia G. G. de Fernicola

2º Examinador

São Paulo, dezembro de 2001

*“Um passo à frente e você não está mais
no mesmo lugar”*
(Chico Science)

Dedico aos meus pais Odacira

e

Wieland.

A minha avó Ester
e
minha irmã Fernanda.

“Sábio é o homem que conhece alguma coisa
sobre tudo e tudo sobre alguma coisa.
O mais sábio é aquele que estuda como se fosse
viver eternamente e vive como
se fosse morrer amanhã.”

*A Doutora Gisela de Aragão Umbuzeiro
pela orientação, dedicação, paciência,
amizade e inspiração, minha gratidão.*

AGRADECIMENTOS

À Deborah, por toda atenção, dedicação, amizade e preocupação comigo e com nosso trabalho.

Aos meus bons amigos da CETESB, Carlos, Célia, Viana, Genival e a todos que me ajudaram, ensinaram e conviveram comigo durante estes ótimos meses.

À minha primeira professora de Toxicologia, Alvorita, por toda ajuda e incentivo, e por ter me inspirado.

Aos meus amigos do curso de pós-graduação Daniela, Jussara, Claudia, Isarita, Michaela, Vanessa, Eliane, Miriam, Maurício e todos os demais que se tornaram “membros da minha família” e sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus companheiros de república Alexandre, Maurício e Emiliano que de fato foram minha família em São Paulo e sempre ao me apoiaram.

Aos professores e funcionários da disciplina de Toxicologia, pelo que aprendi, pelo apoio em todas as horas, pela amizade e por todas as experiências compartilhadas.

A todos os novos amigos que fiz em São Paulo, por tudo que passamos juntos e por tornar suportável a distância da minha família e dos meus bons e velhos amigos de Santa Catarina que também estavam me apoiando à distância (estaremos sempre juntos).

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, minha gratidão.

RESUMO

A combinação do teste de Ames e métodos seletivos de extração para os principais grupos de compostos responsáveis pela atividade genotóxica em amostras ambientais tem sido muito utilizada.

O objetivo foi validar o uso do Blue rayon como alternativa para extração de compostos presentes em águas brutas e tratadas. Foram realizados experimentos comparativos entre o Blue rayon e XAD-4 com amostras fortificadas e amostras reais.

Dois mananciais, um contaminado com compostos policíclicos e outro não, foram estudados. As amostras foram extraídas com resina XAD4, e com Blue rayon, este último seletivo para compostos policíclicos.

Os extratos foram testados com as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 na presença e ausência de mistura S9. O Blue rayon foi menos eficiente na detecção da mutagenicidade total das amostras quando comparado com a XAD-4. Porém foi capaz de distinguir a mutagenicidade já presente na água bruta daquela gerada durante o tratamento.

ABSTRACT

The combination of the Ames test and selective extraction methodologies has been successfully used to indicate the possible classes of organic contaminants in environmental samples.

The aim of this study was to validate the use of Blue rayon as an alternative extraction method to detect compounds in raw and treated waters

Two different water bodies were evaluated and in one of the sites, raw waters were known to be contaminated with polycyclic compounds.

. Experiments comparing the Blue rayon technique with XAD-4 resin were done in environmental and spiked samples.

The extracts were tested for mutagenicity with *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100 , with and without metabolic activation.

Blue rayon was less efficient in detecting the overall mutagenicity of the samples analyzed in comparison with XAD-4. It was able though to distinguish the mutagenicity due to the contaminants in raw from the ones generated by water treatment.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Contaminantes genotóxicos em água.....	4
2.2. Compostos genotóxicos policíclicos	5
2.3. Compostos genotóxicos gerados por processos de cloração.....	8
2.4. Teste de Ames como ferramenta de avaliação da qualidade de águas ..	9
2.5. Métodos de extração de compostos orgânicos presentes em amostras de água para detecção da atividade genotóxica por bioensaios	12
2.5.1. Resinas XAD	14
2.5.2. Blue rayon (BR).....	15
2.5.3. Blue rayon para concentrar amostras de água.....	18
3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO	25
3.1. Objetivo	25
3.2. Plano de Trabalho	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Aparelhagem	26
4.2. Vidraria	27
4.3. Outros materiais	27
4.4. Reagentes	28
4.5. Meios de cultura e soluções	29
4.6. Esterilização e teste de esterilidade	33
4.7. Lavagem de vidraria	33
4.8. Amostragem, coleta, transporte e armazenamento das amostras.....	34
4.8.1. Locais de amostragem	35
4.9. Extração/concentração de amostras	35
4.9.1. XAD-4.....	35
4.9.2. Blue rayon	40
4.10. Procedimentos de lavagem do Blue rayon	44
4.11. Avaliação do desempenho do Blue rayon reutilizado	44
4.12. Teste de mutagenicidade – Teste de Ames.....	45

4.12.1. Linhagens utilizadas	46
4.12.2. Preparo da placa mãe	47
4.12.3. Taxa de reversão espontânea	48
4.12.4. Procedimento do ensaio	49
4.12.5. Interpretação de resultados e análises estatísticas	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1. Eficiência de lavagem do Blue rayon	54
5.2. Avaliação do desempenho do Blue rayon – Ensaio utilizando 2- aminoantraceno (2AA)	56
5.3. Resultados obtidos com o teste de Ames para as amostras de água bruta e tratada analisadas dos pontos de amostragem	59
5.4. Resumo dos dados obtidos para as amostras analisadas	86
6. Conclusões	90
7. Recomendações	91
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1. INTRODUÇÃO

A água é essencial para a vida e, é um dos mais importantes recursos naturais, necessário para a maioria das atividades humanas (FERNÁNDEZ, et al., 1995; KATAOKA, et al., 2000).

Os problemas de poluição ambiental estão muito próximos da vida cotidiana das pessoas em todos os lugares do mundo, e a presença de produtos químicos perigosos ou tóxicos na biosfera tem recebido grande atenção (KATAOKA, 1997). Os micropoluentes orgânicos são um dos problemas mais críticos relativos aos recursos de água para consumo humano, e à proteção dos ecossistemas aquáticos (FILIPIC & TOMAN, 1996).

As águas superficiais e subterrâneas são contaminadas constantemente por grande quantidade e variedade de compostos químicos, provenientes de várias fontes, como por exemplo atividade industrial, atividade agrícola e doméstica (VALENT, 1990). Estas fontes estão associadas ao tipo de uso e ocupação do solo, e possuem características próprias quanto aos poluentes que carregam. O esgoto doméstico, por exemplo, apresenta compostos orgânicos biodegradáveis, nutrientes e bactérias. Já a grande diversidade industrial do estado de São Paulo produz uma grande variedade de poluentes lançados em corpos d'água, relacionados com os tipos de matérias-primas utilizadas e seus processos (CETESB, 2001).

Os efluentes industriais líquidos são considerados como a maior fonte de substâncias antrópicas lançados nos cursos d'água, sendo freqüentemente o fator mais significativo em termos de poluição hídrica (COELHO, 1995).

O deflúvio superficial de áreas urbanas é composto pela variedade de poluentes que se depositam sobre o solo. Estes durante períodos de chuva são arrastados pela água para os cursos de água superficiais, constituindo-se numa fonte de poluição tanto maior quanto mais deficiente for a coleta de esgoto e limpeza pública. Já o deflúvio superficial de áreas agrícolas

depende diretamente das práticas agrícolas regionais, da época do ano em que se realiza o preparo do solo, e o uso de fertilizantes e praguicidas (CETESB, 2001).

Sendo a água um recurso natural esgotável, é uma preocupação mundial o estabelecimento de critérios para a avaliação da qualidade das águas, visando o controle da poluição e a garantia do equilíbrio dos ecossistemas aquáticos, bem como a segurança e saúde das populações humanas (VAN LEEUWEN, 2000). Alguns contaminantes podem ter atividade mutagênica, isso é, serem capazes de alterar o material genético dos organismos. Estas alterações, denominadas mutações, podem ter efeitos deletérios aos próprios indivíduos afetados ou em seus descendentes, ou ainda aumentar a incidência de câncer nas populações (BRUSICK, et al., 1992).

A detecção e identificação de compostos mutagênicos e ou carcinogênicos em água é um passo essencial para se entender os efeitos dos compostos genotóxicos sobre a saúde humana (OGURI, et al., 1998).

Os contaminantes orgânicos presentes na água de abastecimento podem ser divididos em dois grupos: os contaminantes presentes naturalmente ou derivados de atividades humanas na água bruta, e os contaminantes adicionados ou formados durante os processos de tratamento de água destinada ao consumo humano (VAN LEEUWEN, 2000).

Os contaminantes presentes na água bruta são provenientes de substâncias lixiviadas do solo, de diferentes efluentes industriais tratados ou não, do esgoto doméstico, ou de acidentes químicos (VAN LEEUWEN, 2000).

Estes contaminantes podem ser de origem natural, os quais são predominantemente compostos inorgânicos como por exemplo arsênico, e de origem antrópica originados por atividades humanas, que são principalmente os compostos orgânicos em geral, praguicidas e produtos gerados pelo processo de desinfecção da água (VAN LEEUWEN, 2000).

Dois pontos importantes na detecção dos compostos mutagênicos em amostras de água são, a identificação da atividade mutagênica e a

concentração de compostos que geralmente estão presentes em pequena quantidade na amostra (KATAOKA, et al., 2000).

O teste de Ames é amplamente usado como um teste de triagem para avaliar a presença de compostos químicos mutagênicos em amostras ambientais (PARK, et al., 2000). Este teste foi proposto em 1989 como um ensaio de toxicidade para se avaliar mutagenicidade de amostras de água no "Standard Methods APHA (American Public Health Association)" (GUZZELLA & SORA, 1998) e tem sido usado no Brasil desde 1979 pela CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (UMBUZEIRO, et al., 2001).

Os ensaios realizados com amostras de água concentradas, por processos de extração e/ou concentração, fornecem uma resposta direta relacionada às propriedades tóxicas da mistura de compostos presentes na amostra (BAUN & NYHOLM, 1996). São de grande utilidade quando aliados às tradicionais técnicas analíticas desenvolvidas para a avaliação da toxicidade no ambiente (FERNÁNDEZ, et al., 1995).

Para extração de compostos orgânicos presentes em amostras de água geralmente são usadas resinas adsorventes. As mais comuns são copolímeros de estireno-divinilbenzeno, tais como Amberlite XAD-2 e XAD-4 e polímeros de acrilatos como Amberlite XAD-7 e XAD-8 (JUNK, et al., 1974; TOLOSA, et al., 1996).

Resinas XAD concentram vários grupos de compostos orgânicos presentes na amostra (SAKAMOTO, et al., 1996). Outras metodologias no entanto, podem ser utilizadas, como o Blue rayon, descrito no final da década de 80 por HAYATSU, que apresenta seletividade por compostos policíclicos com três ou mais anéis em sua molécula (HAYATSU, 1992).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Contaminantes genotóxicos em águas

Entre a extensa gama de compostos químicos possivelmente presentes como contaminantes nas águas, muitos deles apresentam atividade genotóxica o que pode acarretar graves danos à saúde humana, como por exemplo, um aumento na incidência de câncer em populações cronicamente expostas (BRUSICK, et al., 1992; OGURI, et al., 1998; VAN LEEUWEN, 2000).

A qualidade das águas superficiais do estado de São Paulo é regulada por leis estaduais e federais (BRASIL, 1986; ESTADO DE SÃO PAULO, 1976) e a qualidade das águas de consumo humano também por leis estaduais e federais (BRASIL, 1990; BRASIL, 2001; ESTADO DE SÃO PAULO, 1978; ESTADO DE SÃO PAULO, 1996), sendo que estas regulam algumas características físico-químicas, metais tóxicos e algumas substâncias orgânicas tóxicas como por exemplo benzeno, benzo(a)pireno e praguicidas presentes na água.

Porém, muitas outras substâncias importantes do ponto de vista toxicológico não são reguladas por estas leis, especialmente aquelas que estão envolvidas nos processos de carcinogênese (compostos genotóxicos e os promotores de tumores).

Apenas o benzo(a)pireno é regulado na maioria das legislações. A Organização Mundial de Saúde (OMS) determina como seu limite para água de abastecimento $0,7\mu\text{g/L}$, sendo que a legislação brasileira, na lei de 1990 determinava como limite $0,01\mu\text{g/L}$ e na sua revisão passou a seguir esta orientação da OMS (BRASIL, 2001). Já para a U.S.EPA – United States Environmental Protection Agency seu limite a ser atingido é zero, aceitando-se atualmente até $0,2\mu\text{g/L}$ (U.S.EPA, 2000).

Na legislação canadense, a seção que regula os índices para proteção da vida aquática, estabelece valores máximos permitidos na água para os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs): acenafteno-

5,8µg/L; acridina- 4,4µg/L; antraceno- 0,012µg/L; benzo[a]antraceno- 0,018µg/L; benzo[a]pireno- 0,015µg/L e estão em fase de desenvolvimento os limites para espécies reativas cloradas como as cloraminas. A legislação canadense considera o efluente das indústrias têxteis como um contaminante importante e alvo de estudos para os próximos anos (CANADA, 2001).

Para a legislação americana (FEDERAL REGISTER, 2000) além dos HAPs, algumas aminas aromáticas, como a benzidina e a 3,3-diclorobenzidina, são também regulamentadas.

A presença desses compostos deve ser controlada não apenas com a visão antropocêntrica, mas devem também ser considerados os efeitos sobre as populações aquáticas. Há relatos de tumores em praticamente todas as espécies aquáticas, incluindo microcrustáceos (NOAA, 1999).

BICKHAM, et al., 2000, num artigo de revisão mostra como a presença de compostos mutagênicos pode afetar negativamente a biodiversidade de espécies aquáticas.

O efeito da exposição a estes contaminantes pode ser manifestado em uma série de níveis da organização biológica, desde o molecular até comunidades. Os efeitos moleculares incluem alterações na função/estrutura do DNA ou na expressão gênica. Os efeitos em comunidades incluem perturbação da diversidade da comunidade, de sua estrutura ou sua dinâmica (THEODORAKIS, et al., 2000).

2.2. Compostos genotóxicos policíclicos

Atualmente os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), e as arilaminas têm recebido atenção especial devido ao seu grande potencial mutagênico e carcinogênico, e mesmo que alguns deles não tenham seus limites regulados pelas leis brasileiras, outros países já tem seus limites definidos e seu controle regulamentado como já citado acima.

A produção comercial das arilaminas começou a se desenvolver após a síntese da anilina e dos corantes à base de anilina. Vários estudos

epidemiológicos e em animais de experimentação, relacionam a exposição a esta classe de compostos à neoplasias do trato urinário (BELAND & KADLUBAR, 1994).

Em processos de cozimento a altas temperaturas certos aminoácidos são pirolizados a aminas aromáticas heterocíclicas mutagênicas (BELAND & KADLUBAR, 1994). Entre estas aminas heterocíclicas, 23 são potentes mutágenos detectados pelo teste de Ames, tendo sido determinadas as estruturas moleculares de 19 destas (KATAOKA, 1997).

Recentemente, alguns hidrocarbonetos nitroaromáticos derivados de uma série de processos de combustão são detectados no meio ambiente, e assim como as aminas aromáticas heterocíclicas, alguns destes agentes também são potentes mutágenos para bactérias e carcinogênicos para animais de laboratório (BELAND & KADLUBAR, 1994).

Como a maior parte dos carcinógenos químicos, as arilaminas precisam ser biotransformadas a eletrófilos reativos para exercer seus efeitos carcinogênicos. Normalmente as aminas aromáticas e as amidas são inicialmente *N*-oxidadas a *N*-hidroxiarilaminas e *N*-hidroxiarilamidas, sendo estas reações catalisadas em ratos pelo citocromo P-450 (BELAND & KADLUBAR, 1994).

A ativação dos hidrocarbonetos nitroaromáticos se dá inicialmente pela formação de uma *N*-hidroxiarilamina, reação catalisada por enzimas microssomais e citosólicas. Estes compostos de biotransformação são capazes de se ligar ao DNA formando adutos. Por exemplo, 3-amino-1-metil-5*H*-pirido[4,3-*b*] indol (Trp-P-2) após a ativação enzimática pelo citocromo P-450 gera o *N*-(deoxiguanosina-8-yl)-Trp-P-2 que é um eletrófilo reativo (BELAND & KADLUBAR, 1994).

Os HAPs são formados como produtos da combustão incompleta de material orgânico e estão presentes em quantidades consideráveis em combustíveis derivados de petróleo (HALL & GROVER, 1994).

Entre as fontes de HAPs que contaminam o ambiente, podem ser citadas a combustão nos sistemas de aquecimento doméstico, motores movidos a derivados de petróleo, várias atividades industriais, cigarros e

outras. Nesta classe de compostos estão contidos entre 100 e 300 hidrocarbonetos diferentes, sendo que se estima uma emissão de benzo[a]pireno, somente nos Estados Unidos da América, de 1200 toneladas/ano (HALL & GROVER, 1994).

Considerando-se que apenas microgramas destes HAPs são suficientes para iniciar tumores em pele de camundongos, provavelmente seja grande o risco de populações humanas desenvolverem câncer devido à poluição ambiental, pois essa classe de compostos pode estar presente no meio ambiente em grandes quantidades (HALL & GROVER, 1994).

Do ponto de vista químico, os HAPs se comportam como compostos inertes, mas devido à sua característica lipofílica, têm tendência a se acumular nos organismos. Eles são biotransformados à compostos mais hidrosolúveis para poderem ser excretados. Paradoxalmente, se os HPAs não são biotransformados estes não são cancerígenos (HALL & GROVER, 1994).

O benzo[a]pireno (BaP) pode sofrer uma série de biotransformações, envolvendo várias enzimas citosólicas e microssomais, gerando um grande número de eletrófilos reativos capazes de formar adutos de DNA (HALL & GROVER, 1994).

A estratégia utilizada pela maioria dos pesquisadores para detectar e monitorar compostos com atividade mutagênica são os bioensaios, como por exemplo o teste de Ames, associados aos métodos tradicionais de identificação química, como a cromatografia líquida e cromatografia à gás. Tanto para a execução dos bioensaios como para a identificação química, a etapa de extração e/ou concentração das amostras é necessária, tornando fundamental o desenvolvimento de procedimentos adequados para cada caso específico de contaminação ambiental (HAYATSU, 1992; SAKAMOTO, et al., 1996). Além disso, a seleção de linhagens apropriadas no teste de Ames, juntamente com processos de extração mais seletivos, pode sugerir as possíveis classes de compostos presentes na mistura analisada.

2.3. Compostos genotóxicos gerados por processos de cloração

A etapa de cloração no processo de tratamento de água para consumo é responsável também pela formação de muitos compostos mutagênicos, que podem ser detectados pelo teste de Ames em amostras de água tratada, após concentração (MEIER, 1990). STOPPE et al., 1998, realizaram um estudo em duas estações de tratamento de água da região metropolitana de São Paulo e mostraram que, embora não houvesse mutagenicidade detectável na água bruta, foi encontrada a atividade mutagênica nas águas tratadas. Esta mutagenicidade foi detectada com as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, sem ativação metabólica, apenas nos extratos obtidos em pH ácido.

Águas com alto conteúdo de matéria húmica e tratadas com cloro apresentam altas concentrações de compostos orgânicos halogenados formados como produtos da reação entre o cloro livre e os ácidos húmicos, e que são responsáveis por grande parte da mutagenicidade detectada na água de beber (MIETTINEN, et al., 1998).

Os compostos mais comuns formados pelas reações entre o cloro e substâncias húmicas presentes na água são os trialometanos, ácidos halogenados e furanonas (VAN LEEUWEN, 2000; BACKLUND, et al., 1989). Muitos deles são genotóxicos, detectados pelo teste de Ames como por exemplo bromocloroacetonitrila, dicloroacetonitrila e ácido dicloroacético preferencialmente extraídos da amostra em pH ácido (2,0) (SCHENCK, et al., 1998).

A estratégia mais utilizada para detectar esta classe de compostos em amostras de água é a realização de ensaios de genotoxicidade, como o teste de Ames, combinados com análise cromatográfica acoplada a espectrometria de massa. Para a execução destas análises são necessários procedimentos de extração validados e eficientes, para a extração de compostos suspeitos ou de interesse, presentes nestas amostras (GUZZELLA & SORA, 1998; CARRARO, et al., 2000).

2.4. Teste de Ames como ferramenta de avaliação da qualidade de águas

Dentre os testes com microorganismos, o teste de Ames é considerado o método mais reprodutível, sensível, simples, econômico e rápido para a avaliação da genotoxicidade de amostras de águas (FERNÁNDEZ, et al., 1995).

O teste de AMES foi desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames no início da década de 70 (AMES, 1971; AMES, et al., 1975), e CLAXTON, et al., 1987, elaboraram as principais diretrizes para a realização desse ensaio e interpretação de seus resultados, visando maior uniformidade nos dados gerados, além de maior concordância entre dados gerados em laboratórios que usam o teste de Ames em todo mundo.

Este teste foi revisado por MARON & AMES, 1983, e por MORTELMANS & ZEIGER, 2000, sendo o teste bacteriano de curta duração mais utilizado, em todo o mundo, para a detecção da atividade mutagênica, não somente em amostras de águas, mas também em efluentes líquidos e outras amostras ambientais.

É um ensaio de mutação gênica reversa onde são empregadas linhagens de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para histidina (*his*⁻) derivadas da linhagem parental LT2. Cada linhagem possui uma mutação em um dos genes do operon responsável pela biossíntese da histidina, sendo necessária uma nova mutação para que as células revertam a prototrofia para este aminoácido (*his*⁺) (McCANN & AMES; 1977). Este ensaio foi especialmente desenvolvido para detectar grande variedade de mutágenos que causam tanto mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura, bem como troca de pares de bases do DNA (McCANN & AMES, 1977; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Quando a linhagem teste de *S. typhimurium* é semeada em ágar mínimo com pequenas quantidades de histidina, somente as bactérias que sofreram reversão da mutação no operon da histidina (*his*⁻ para *his*⁺) são

capazes de se desenvolver e formar colônias (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

As linhagens de *S. typhimurium* mais utilizadas são a TA98 e a TA100, pois elas têm se mostrado muito eficientes na detecção de grande número de mutágenos. Segundo MORTELMANS & ZEIGER, 2000 o uso destas duas linhagens na presença e ausência de ativação metabólica é suficiente para detectar 90% dos mutágenos pertencentes aos 35% de compostos químicos mutagênicos conhecidos

As linhagens de *S. typhimurium* utilizadas no teste de Ames possuem ainda outras características genéticas que lhes conferem maior sensibilidade, como: a mutação *rfa* que causa perda parcial da barreira lipopolissacarídica da parede bacteriana, tornando-a mais permeável a moléculas de grande tamanho e peso molecular como HPAs, aminas aromáticas e aflatoxinas. A deleção *uvrB*, presente na maioria das linhagens, consiste na deleção deste gene que é um dos responsáveis pelo reparo de excisão, impedindo a reparação dos danos causados e facilitando sua expressão. Devido a técnica empregada, foi deletado também parte do gene que codifica para a biotina, tornando as linhagens *uvrB*- também auxotróficas para esta vitamina. As linhagens TA98 e TA100 apresentam também o plasmídeo pKM101, que contém o gene *muc*, responsável pelo aumento do sistema de reparo SOS do tipo passível de erro e sua presença aumenta consequentemente a mutagênese. Este plasmídeo tem como marcador a resistência à ampicilina. A diferença entre elas é que a TA98 detecta mutágenos que causam mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura enquanto que a TA100 detecta mutações do tipo substituição de pares de bases (MARON & AMES, 1983).

O teste de Ames se tornou mais efetivo e capaz de detectar mutágenos indiretos, que não são compostos mutagênicos *per se*, mas quando bioativados, principalmente, pelo fígado dos mamíferos tornam-se mutagênicos, pois foi incluído ao teste um sistema de metabolização *in vitro*. Este sistema é denominado mistura S9, que é o sobrenadante do homogeneizado de fígado de animais de laboratório tratados com algum

indutor enzimático, na maioria dos casos a bifenila policlorada AROCLOR 1254 e cofatores (MARON & AMES, 1983).

Estão sendo desenvolvidas várias linhagens teste com diferentes mutações e adição de múltiplas cópias de plasmídios, algumas delas contendo os genes das enzimas nitrorredutase e acetiltransferase com o objetivo de torná-las linhagens mais sensíveis para detecção respectivamente de nitroarenos e aminas aromáticas.

O teste de Ames tem demonstrado alta sensibilidade para detectar tanto as arilaminas quanto os HPAs, especialmente com a linhagem TA98 com e sem ativação metabólica (HAYATSU, et al., 1983b; KIRA, et al., 1995).

Os compostos formados pelo processo de cloração tem normalmente comportamento diferente das aminas aromáticas e dos HPAs para o teste de Ames. A presença destes é melhor detectada com a linhagem TA100 na ausência de ativação metabólica, com exceção do ácido monocloroacético. Além disso, em presença de ativação metabólica sua atividade genotóxica normalmente diminui (GILLER, et al., 1997). Assim, os mutágenos indiretos presentes na água bruta, que são ativados após o contato com enzimas hepáticas, apresentam provavelmente, maior risco à saúde humana que os mutágenos diretos formados durante o tratamento (desinfecção por cloração), que são inativados após a ação destas enzimas (BACKLUND, et al., 1989; MEIER, 1990).

Desde 1979, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do estado de São Paulo (CETESB) avalia a qualidade das águas utilizando o teste de Ames para detectar atividade genotóxica, e em mais de mil amostras já analisadas durante este período, 137 amostras foram consideradas positivas. Em algumas amostras a potência observada foi de mais de 30.000 revertentes por litro. (UMBUZEIRO, et al., 2001)

Este teste é muito utilizado como ferramenta para caracterização de reservatórios de águas contaminadas, monitoramento da rede de abastecimento e desenvolvimento de novas metodologias analíticas.

2.5. Métodos de extração de compostos orgânicos presentes em amostras de água para detecção da atividade genotóxica por bioensaios

Qualquer amostra líquida livre de bactérias, teoricamente, pode ser testada pelo teste de Ames desde que a amostra seja solúvel em solvente orgânico biologicamente compatível com a linhagem bacteriana usada, e que não apresente toxicidade suficiente para interferir no teste.

Todo procedimento de extração visa a caracterização mais fiel possível dos compostos orgânicos com atividade mutagênica presentes na amostra, inclusive os compostos voláteis. Porém, nenhum processo de concentração e/ou extração é capaz de manter no extrato todas as classes de compostos orgânicos possivelmente contidos na amostra, todos têm perdas de certos grupos de compostos químicos. Devido a etapa de secagem sob fluxo de nitrogênio ocorre a perda dos compostos voláteis, sendo detectados pelo teste de Ames apenas os compostos semi-voláteis.

FILIPIC & TOMANM, 1996, afirmam que, como consequência dos processos de extração/concentração, acontecem modificações na amostra original, onde alguns compostos são perdidos e ou modificados (inativados ou ativados), e interações entre compostos nessa mistura complexa modificada podem ser diferentes das que ocorrem na amostra original.

Amostras ambientais líquidas, como as águas, podem ser testadas diretamente após esterilização por filtração através de membranas usando o procedimento de concentração *in situ*. Este procedimento consiste na diluição da amostra filtrada em meio de cultura ágar de superfície mais concentrado que o usual, o que possibilita a incorporação de um volume de amostra maior que o usual por placa no teste de Ames, sendo que o volume máximo suportado usualmente é de 2mL. Este método também apresenta perdas, como por exemplo, os compostos orgânicos ligados às partículas suspensas na amostra e pode também apresentar um resultado falso negativo devido às concentrações muito baixas de compostos genotóxicos

no volume de amostra testado (VARGAS, et al., 1995; VALENT, et al., 1999).

Normalmente os contaminantes químicos presentes em amostras de água encontram-se em concentrações de partes por milhão (ppm) ou partes por bilhão (ppb), tornando necessário a utilização dos processos de concentração e/ou extração para tornar possível a detecção da atividade mutagênica atribuída aos compostos orgânicos diluídos em grandes volumes de amostra. Procedimentos como extração líquido/líquido, frascos de evaporação, filtração por membranas e resinas adsorventes do tipo Amberlite XAD são muito utilizadas para este fim (DUTKA, et al., 1981).

Métodos de extração em fase sólida apresentam resultados convenientes para isolamento de compostos orgânicos, presentes em grandes volumes de água quando comparado com a convencional extração líquido/líquido (TOLOSA, et al., 1996).

Visando maior seletividade nos procedimentos de extração, novos métodos foram desenvolvidos como, por exemplo, a extração em micro colunas e as novas fibras adsorventes como o Blue rayon (HAYATSU, 1992).

Amostras gasosas e sólidas, como ar e solo, também podem ser testadas pelo teste de Ames, porém estas têm que ser levadas ao estado líquido por um método padronizado, o que torna os processos de extração e/ou concentração indispensáveis para possibilitar a realização de uma análise efetiva e coerente. Estes procedimentos devem ser padronizados de acordo com o tipo da amostra, de forma que atendam o objetivo proposto pela análise.

2.5.1. Resinas XAD

Entre os procedimentos de extração e/ou concentração citados, a extração líquido/líquido e as resinas do tipo Amberlite XAD são os mais aplicados nos laboratórios do mundo inteiro, sendo que os polímeros mais utilizados são copolímeros de estireno-divinilbenzeno, como por exemplo Amberlite XAD-2 e XAD-4, e polímeros de acrilato como Amberlite XAD-7 e XAD-8 (TOLOSA, et al., 1996).

JUNK, et al., 1974, realizaram o primeiro estudo normativo para utilização da resina XAD-2 como método de concentração de grande número de compostos orgânicos. Este estudo determina uma série de etapas necessárias para sua utilização segura, e elucida várias propriedades desse tipo de resina.

WIGILIUS, et al., 1987, compararam a extração com XAD com a extração líquido-líquido, e obtiveram resultados muito semelhantes para o teste de Ames. Porém ao submeter à análise cromatográfica, observaram diferenças na composição dos extratos obtidos.

Muitos trabalhos têm descrito métodos analíticos em que a resina XAD-2 foi usada para concentrar quantidades muito baixas de compostos como hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos poliaromáticos e praguicidas clorados de amostras de água (KIMIKO, et al., 1995). Quando a composição química das amostras de água, em estudos ambientais, é desconhecida, e quando é necessária a extração de todos os compostos químicos polares e apolares potencialmente tóxicos e genotóxicos presentes, as resinas tipo XAD são amplamente utilizadas (GUZZELLA & SORA, 1998).

A extração em fase sólida usando resina XAD-2 parece ser muito eficiente para concentrar os xenobióticos, tanto os de caráter polar como apolar, que contribuem para a toxicidade de amostras de água (BAUN & NYHOLM, 1996).

Experimentos de adsorção com resinas, sugerem que a adsorção de solutos orgânicos se dá através de forças de Van der Waals, o que permite uma fácil desorção das moléculas adsorvidas. A capacidade adsorvente de uma resina depende, em parte, do seu tratamento, das condições de fabricação e da sua composição (TOLOSA, et al., 1996).

O manual da EPA - Environmental Protection Agency (1985), recomenda o uso da resina XAD, seguida de eluição e concentração em solvente biologicamente compatível, para análise de água frente ao teste de Ames.

Um protocolo, com o objetivo de normatizar o procedimento de extração orgânica de amostras de água, utilizando resinas XAD, foi proposto por PELLIZZARI, et al., 1984, incluindo também todas as condições de eluição e concentração.

A resina utilizada no presente trabalho é a Amberlite XAD-4 que é um copolímero hidrofóbico de estireno-divinilbenzeno com uma área específica de superfície de $750 \text{ m}^2/\text{g}$ e um diâmetro de poros de $50\text{\AA}$ e suas características bem como os resultados de trabalhos realizados com XAD-4 são muito semelhantes à XAD-2 (DRESSLER, 1979).

2.5.2. Blue rayon (BR)

Em 1983 foi descoberto que fibras de algodão ligadas covalentemente a ftalocianina de cobre tiosulfato (Blue cotton) formavam um adsorvente específico para compostos com estrutura policíclica (HAYATSU, et al., 1996).

Os derivados ftalocianinas de cobre são uma das classes de pigmento azul amplamente utilizadas pela indústria (HAYATSU, et al., 1983a).

A descoberta do Blue cotton (Figura 1) ocorreu por acaso e teve início com os estudos de moduladores de mutagênese utilizando o teste de Ames (HAYATSU, 1992).

Um estudo utilizando a hematina (cloreto de ferroporfirina que contém ferro trivalente) como modulador, revelou uma inibição de parte da atividade

mutagênica do Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimetil-5H-pyrido[4,3-b]indol), porém esta hemeproteína não inibia a atividade mutagênica de outros compostos que não possuíam três ou mais anéis fundidos em sua molécula (HAYATSU, 1992).

HAYATSU, em 1983, realizou um estudo que mostrou que o pó de giz azul de uma sala de conferências apresentava atividade mutagênica detectada pelo teste de Ames, mas que o pó de giz branco da mesma sala não. Durante a investigação química do pigmento azul contido no giz, descobriu-se que se tratava da ftalocianina de cobre, que possuía estrutura molecular planar muito semelhante à da hematina e, assim, também propriedades semelhantes (HAYATSU, 1992).

Para que estas moléculas pudessem ser utilizadas como ligantes para compostos orgânicos policíclicos estas deveriam estar ligadas covalentemente a um suporte sólido inerte. A hematina não pode ser ligada a nenhum suporte, mas a ftalocianina de cobre, sim (HAYATSU, 1992).

Desta forma, HAYATSU, et al., 1983b, desenvolveram o Blue cotton, e nesse mesmo ano começaram a testar sua possível utilização como adsorvente de compostos orgânicos presentes em amostras brutas, tais como, alimentos, águas e materiais biológicos, e sua eluição utilizando solventes orgânicos.

Neste primeiro trabalho foram utilizadas substâncias mutagênicas e não mutagênicas. As mutagênicas utilizadas foram as que tem atividade para a linhagem TA98 com ativação metabólica (mistura S9) no teste de Ames por exemplo 3-amino-1,4-dimetil-5H-pyrido[4,3-b]indol (Trp-P-1) com recuperação de 98% e benzo[a]pireno com recuperação de 60%. Entre as não mutagênicas foram testadas as substâncias que podem interferir no teste de Ames como a histidina com recuperação de 0,7% e ácido oleico sem recuperação alguma (HAYATSU, et al., 1983b).

Neste estudo concluiu-se que o Blue cotton adsorvia compostos policíclicos de estrutura planar, tanto de soluções preparadas com padrões específicos como de amostras naturais, e que estes compostos adsorvidos poderiam ser eluídos com uma simples solução de metanol/amônio (50:1

v/v). Este extrato poderia ser processado e utilizado no teste de Ames (HAYATSU, et al., 1983b).

VARTIAINEN, et al., 1987, realizaram um estudo com o objetivo de encontrar compostos orgânicos formados pelo processo cloração da água com atividade mutagênica, e concluíram que o Blue cotton não era adequado para recuperar compostos mutagênicos em água tratada sendo que seu método utilizava extração em pH ácido (pH=2) e alcalino (pH=11) e apenas as linhagens TA98 e TA100 sem ativação metabólica para o teste de Ames.

O Blue rayon é um conjunto de fibras de rayon ligadas covalentemente a ftalocianina de cobre tiosulfato, contendo 2-3 vezes mais ligantes que o Blue cotton (SAKAMOTO & HAYATSU, 1990) e tem sido utilizado como adsorvente de substâncias com estrutura molecular planar e policíclica contidas em amostras brutas como alimentos, águas e materiais biológicos (HAYATSU, 1992).

O mecanismo pelo qual o Blue cotton e o Blue rayon conseguem adsorver os compostos químicos com três ou mais anéis em sua molécula está diretamente relacionado com a característica planar deste tipo de moléculas (HAYATSU, 1992).

Fig. 1 - Estrutura molecular do Blue cotton

2.5.3. Blue rayon para concentrar amostras de água

SAKAMOTO & HAYATSU, 1990, utilizaram o Blue rayon para monitorar as águas do rio Yodo através de dois métodos. No primeiro, o Blue rayon era acondicionado em redes e mergulhado no rio, nos pontos de amostragem, por 24 horas. Este método foi denominado Blue rayon *in situ*. No segundo método, 1L da água do ponto de amostragem era coletado e levado ao laboratório onde mergulhava-se 0,5g de Blue rayon e era agitada por 30 minutos. Ambos apresentaram resultados positivos para o teste de Ames realizado com as linhagem TA98 com e sem ativação metabólica.

Este estudo comparou também o Blue rayon com fibras de Rayon sem o adsorvente ligado, e apenas o Blue rayon apresentou capacidade de adsorver compostos orgânicos (SAKAMOTO & HAYATSU, 1990).

As águas dos rios Chao Phraya, em Bangkok, e Sumida e Ara, em Tóquio, foram monitoradas quanto à mutagenicidade, entre 1993 e 1994 por KUSAMRAN pelo método Blue rayon *in situ* (SAKAMOTO & HAYATSU, 1990), combinado ao teste de Ames. As coletas foram realizadas em períodos de cheia e de seca sendo que os resultados obtidos mostraram que durante os períodos de seca foi detectada uma atividade mutagênica mais elevada. Isso pode ser explicado pela diluição dos compostos mutagênicos durante os períodos de cheia (KUSAMRAN, et al., 1994).

Os compostos mutagênicos recuperados das amostras neste estudo não foram identificados, porém devido à especificidade do Blue rayon e de sua atividade mutagênica ter sido detectada na presença de ativação metabólica com uma linhagem de *S. typhimurium* com forte atividade da enzima acetiltransferase, sugeriu-se que os mutágenos pertenciam à classe das arilaminas (KUSAMRAN et al., 1994).

O Blue rayon mostrou-se eficiente e conveniente também para o monitoramento de águas marinhas. KIRA, et al., 1995, realizaram o monitoramento da atividade mutagênica e do conteúdo de benzo(a)pireno em cinco áreas na região de Okayama entre 1991 e 1992 avaliando as águas e moluscos destas áreas.

Os resultados encontrados foram bastante coerentes entre as amostras de água e entre as amostras de moluscos, mas não entre si, o que pode ser explicado pelo fato de que as amostras de água representam apenas o momento em que a amostra foi coletada enquanto os moluscos representam uma exposição de longo prazo.

KIRA, et al., 1995, consideram como vantagens do método que utiliza o Blue rayon a sua seletividade e a possibilidade de se fazer um acompanhamento diário de áreas distantes, sem a necessidade de coleta e transporte de grandes volumes de amostra.

Após um derramamento de óleo na Baía de Galveston, KIRA, et al., 1994, utilizaram o Blue rayon para caracterizar a poluição do local e detectar a mutagenicidade. Análises cromatográficas demonstraram a adsorção no Blue rayon de HPAs mutagênicos e não mutagênicos, concluindo que ele é prático e conveniente para monitorar a mutagenicidade em ambientes marinhos.

HAYATSU, et al., 1996, desenvolveram uma coluna para extração em fase sólida chamada de coluna de Blue chitin, que contém o dobro de ligantes que o Blue rayon e oferece como vantagens maior seletividade e eficiência para concentrar moléculas policíclicas planares, facilidade de manipulação e rapidez nas análises.

A coluna de Blue chitin é formada pela ligação covalente entre a ftalocianina de cobre tiosulfato e a poli-N-acetil-glicosamina, empacotada em colunas de extração em fase sólida (HAYATSU, et al., 1996).

OHE, 1997, utilizou o Blue rayon como método para concentrar suas amostras e posteriormente quantificar quatro aminas aromáticas das águas do rio Yodo. Para isso utilizou-se de técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência, comprovando a presença de 2-amino-3,8-dimetilimidazol[4,5-f]quinoxalina (MeIQx), 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol (Trp-P-1), 3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indol (Trp-P-2) e 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5-b]piridina (PhPI) e suas quantidades. Foi realizado também o teste de *umu* obtendo boa correlação dos dados obtidos, onde o MeIQx

representou 5,5% da atividade genotóxica observada, o Trp-P-1 representou 15,6%, o Trp-P-2 representou 2,5% e o PhPI 0,5%.

NUKAYA, et al., 1997, utilizaram o Blue rayon e o Blue cotton para monitorar as águas do rio Nishitakase em Kyoto. Nos extratos obtidos tanto do Blue rayon quanto do Blue cotton, foram isoladas cinco compostos mutagênicos, que somaram juntos 67% da atividade mutagênica total dos extratos. Um destes compostos, responsável por 21% da mutagenicidade encontrada, foi identificado por cristalografia por raio-X, como sendo 2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-metoxietil)amino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2*H*-benzotriazol (PBTA-1), um potente composto mutagênico indireto, que apresenta atividade mutagênica após sofrer ativação metabólica. Como este composto não é listado como sendo de uso industrial, o autor sugere que ele deva ter sido formado a partir de corantes presentes nos efluentes industriais, tratados nas estações de tratamento de águas e efluentes localizadas às margens deste rio.

Um ano mais tarde, OGURI, et al., 1998, identificaram outro composto do estudo anterior (NUKAYA, et al., 1997), que representava 17% da atividade mutagênica total dos extratos obtidos do Blue rayon e do Blue Cotton. Este foi identificado com auxílio das mesmas técnicas utilizadas para identificar o PBTA-1, como sendo 2-[2-(acetilamino)-4-[*N*-(2-cianoetil)etilamino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2*H*-benzotriazol (PBTA-2) que também é um potente composto mutagênico para as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e YG1024 (com atividade da enzima acetiltransferase) em presença da mistura S9. Como o PBTA-1, o PBTA-2 encontrado deve ter sido um produto gerado a partir de azocorantes formados por redução e cloração nas estações de tratamento de esgoto e efluentes localizadas às margens do rio Nishitakase.

OTSU, et al., 1998, utilizaram o teste de Ames e o Blue rayon para avaliar a distribuição e as características dos mutágenos presentes nas águas de três rios da Korea. Este estudo conclui que os rios que recebiam apenas esgoto doméstico e resíduos de produtos usados na agricultura não apresentavam atividade mutagênica, porém, o rio que recebia efluentes

indústrias apresentou alta atividade mutagênica para a linhagem TA98 com mistura S9 (> 2000 revertentes/placa), sugerindo mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura do DNA, e ressaltando a importância da identificação dos compostos responsáveis por esta atividade mutagênica para se avaliar o risco ao qual a população humana está exposta.

Ainda como continuação do trabalho de NUKAYA, et al., 1997, foi identificado o composto responsável por outros 12% da atividade mutagênica total como sendo o 2-[2-(acetilamino)-4-amino-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol (PBTA-4). Este composto é um potente mutágeno, que induziu $1,9 \times 10^5$ e $7,8 \times 10^6$ revertentes de *Salmonella typhimurium* TA98 e YG1024 por micrograma, respectivamente, em presença de mistura S9 (NUKAYA, et al., 2001).

Os PBTAs são esperados como produtos formados a partir de dinitrofenilazo corantes, usados em processos industriais, por exemplo em indústrias têxteis. Estes podem ser formados durante a cloração de efluentes industriais em estações de tratamento de efluentes e posteriormente lançados nos rios (OHE, et al., 1999a; NUKAYA, et al., 2001).

KIRA, et al., 1998, concluíram que o método utilizando o Blue rayon *in situ*, era aplicável para monitoramento de poluentes no ambiente aquático, através da similaridade da eficiência na recuperação de benzo(a)pireno pelo Blue rayon, em comparação com um método portátil que utiliza microcolunas de extração em fase sólida. A influência do fluxo das marés que poderia ser o principal fator limitante para a utilização do Blue rayon, foi corrigido, com um modelo matemático.

OHE, et al., 1999b, quantificaram duas aminas aromáticas mutagênicas PBTA-1 e PBTA-2 no Rio Yodo utilizando o Blue rayon em colunas para concentrar as amostras e cromatografia líquida de alta eficiência para sua identificação e quantificação. Nos mesmos extratos a mutagenicidade também foi avaliada. Nas amostras coletadas à montante das estações de tratamento de efluentes as aminas não foram detectadas e os testes de mutagenicidade apresentaram resultados baixos ou negativos. Porém, nas amostras coletadas à jusante das estações de tratamento, as

concentrações de PBTA-1 variaram entre < 0,01- 1,91ng/L e de PBTA-2 entre < 0,01- 2,25ng/L, apresentando também resultados positivos para os testes de mutagenicidade.

ONO, et al., 2000, utilizaram o Blue rayon para identificar aminas heterocíclicas em águas de rios próximos à cidade de Kyoto onde se localizavam várias estações de tratamento de efluentes e de esgoto doméstico, sendo que estas águas eram captadas, à jusante, por estações de tratamento de água de abastecimento. Neste estudo, os autores identificaram por espectrometria de massa a presença de 3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indol (Trp-P-2) na fração genotóxica, obtida por separação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foi concluído que esta substância era derivada dos efluentes das estações de tratamento de efluentes e esgoto doméstico presentes na região.

Três aminas heterocíclicas mutagênicas foram identificadas por KATAOKA, et al., 2000, no rio Danúbio utilizando o Blue rayon. Estas aminas são 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol (Trp-P-1), 2-amino-3-metilimidazol-[4,5-f]quinolina (IQ) e 2-amino-9H-pirido[2,3-b]indol (AαC) que representavam 26% da atividade mutagênica total do extrato obtido com o Blue rayon, para o teste de Ames utilizando a linhagem TA98 com mistura S9.

A solubilidade do benzo(a)pireno (BaP) em água é muito pequena, e para quantificar sua quantidade total em amostras de água, NOGAMI, et al., 1999 usaram o Blue rayon para avaliar as quantidades de BaP dissolvidos e a extração sólido-líquido para, determinar as quantidades de BaP ligados a sólidos suspensos na amostra. Do total de BaP encontrado nas amostras cerca de, 60-70% estavam ligados aos sólidos suspensos e o restante dissolvido na amostra.

FUKAZAWA, et al., 2001 utilizaram o Blue rayon para concentrar em efluentes industriais, e posteriormente identificar por cromatografia a gás acoplada a um espectrômetro de massa um composto chamado Harman (9H-pirido[3,4-b]indol) e seus derivados mono clorados que não são mutagênicos para a TA98, na ausência e na presença de ativação

metabólica. No entanto quando testada em conjunto com aminas aromáticas não mutagênicas como a anilina *o*-toluidina e mistura S9, começam a apresentar atividade mutagênica, por isso são chamados de co-mutágenos. Foram recuperados pelo Blue rayon, nos efluentes industriais analisados, após 24h de contato, 1-45ng/gBR de Harman monoclorado e 110-730ng/gBR de Harman.

WATANABE, et al., 2001, sintetizaram o 2-[4-[bis(2-acetoxietil)amino]-2-(acetilamino)-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2*H*- benzotriazol (PBTA-5), um produto de redução do corante “Disperse Blue 79:1”, e o 2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-hidroxietil)amino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2*H*- benzotriazol (PBTA-6) um produto de hidrólise do PBTA-5. Ambos são potentes mutágenos para a linhagem de *S. typhimurium* YG1024 na presença de ativação metabólica.

Tanto o PBTA-5 como o PBTA-6 estão presentes nos efluentes de indústrias têxteis porém apenas o PBTA-6 foi detectado nas amostras analisadas neste estudo, em níveis de 3 a 134 ng/g de Blue rayon.

Estudos de comparação entre o Blue rayon e outros métodos de extração/concentração foram realizados por vários autores (DUTKA, et al., 1993; OHE, 1996; SAKAMOTO, et al., 1996).

DUTKA, et al., 1993, compararam quatro métodos de concentração de amostra, incluindo o Blue rayon. Os resultados negativos para os extratos obtidos com o procedimento que utilizou o Blue rayon, podem ser explicados por sua alta seletividade e especificidade.

OHE, 1996, realizou um estudo no rio Yodo em Kyoto utilizando as linhagens de *Salmonella typhimurium* NM2009 e NM2000 que contêm várias cópias do gene que codifica a enzima O-acetiltransferase que as tornam mais sensíveis a nitrocompostos, na presença e ausência de ativação metabólica, visando detectar compostos genotóxicos diretos e indiretos como por exemplo nitroarenos e ou aminas aromáticas usando XAD e Blue rayon para concentrar as amostras. Os resultados obtidos mostraram-se positivos tanto para os extratos obtidos com XAD como com o Blue rayon. Em alguns pontos de amostragem as duas técnicas de concentração de

amostra apresentaram resultados semelhantes, e em outros a resina XAD se mostrou mais eficiente na recuperação de atividade genotóxica, o que pode ser devido a seletividade do Blue rayon para certas classes de compostos.

SAKAMOTO, et al., 1996, usaram amostras do rio Katsura, que apresentava atividade mutagênica alta, e do rio Asahi, com atividade mutagênica moderada, para avaliar a eficiência de três técnicas de concentração de amostra, XAD-2, Blue rayon *in situ* e Blue chitin. Em ambos locais de amostragem os resultados obtidos foram mais altos com a linhagem TA98 em presença de ativação metabólica (mistura S9). Os autores concluíram que, para o teste de Ames utilizando a TA98 na presença de S9, e para o monitoramento destes rios, as colunas de Blue chitin são mais eficientes e mais precisas que as colunas preparadas com a resina XAD-2 em avaliações quantitativas, e que, para avaliar a presença de compostos mutagênicos presentes nos rios analisados o Blue rayon *in situ* é o método mais sensível e conveniente entre os três avaliados.

3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

3.1. Objetivo

O objetivo deste trabalho é validar o uso do Blue rayon como alternativa para extração mais seletiva de compostos genotóxicos de amostras de água bruta provenientes de mananciais e de água tratada no sistema de tratamento de águas da região metropolitana da São Paulo.

3.2. Plano de trabalho

O plano de trabalho delineado para cumprimento do objetivo proposto consta de:

Revisão bibliográfica abrangendo vários aspectos relacionados à poluição ambiental, métodos de extração e/ou concentração de amostras, ensaios microbianos de genotoxicidade e usos de Blue rayon relacionados a amostras ambientais.

Padronização de um método de lavagem e de extração em colunas para o Blue rayon.

Realização de duas campanhas de coleta de amostras em locais selecionados pertencentes à rede de monitoramento da qualidade das águas superficiais do Estado de São Paulo realizado pela CETESB.

4. Material e Métodos

4.1. Aparelhagem

Agitador do tipo *vortex* (FISHER SCIENTIFIC- mod.232)

Autoclave (LUFERCO)

Balança analítica (METTELER TOLEDO mod-AT201)

Balança semi-analítica(METTELER TOLEDO mod-PB3002-S)

Banho-maria (FANEM mod. 100)

Banho seco (SYBRON/THERMOLINE mod db 16525)

Capela de segurança biológica (câmara de fluxo laminar vertical) (TROX TECHNIK – classe 2B)

Capela de segurança química (COMTEC ENGENHARIA de LABORATÓRIO)

Contador de colônias (ACCUCOUNT 1000 – BIOLOGICS)

Estufa para esterilização e secagem (FANEM mod. 320E)

Evaporador rotatório (BÜCHI)

Freezer -20°C (ELETROLUX)

Freezer -70°C (REVCO mod. ULT1386-7D29)

Incubadora bacteriológica (REVCO mod. BOD50A14)

Incubadora com agitação (NEW BRUNSWICK INC. SCIENTIFIC mod G24)

Máquina de lavar vidraria (LANCER)

Mesa agitadora alternativa (*shaker*) (NEW BRUNSWICK INC. SCIENTIFIC mod-R2)

Placa aquecedora (CORNING mod PC-420)

Potenciômetro(FISHER SCIENTIFIC- mod.15-077-8D)

Refrigerador (ELETROLUX)

Termômetros digitais de máxima e mínima (FISHER SCIENTIFIC- ACCUMET mod-15)

Ultra purificador de água (USF-ELGA)

4.2. Vidraria

Ampolas de Kuderna

Balões de evaporação

Beckers

Colunas com placa porosa

Erlenmeyers

Frascos de coleta

Frascos para preparo de meio de cultura

Frascos para soluções

Galões de 20L

Pipetas

Soxhlet

Tubos de ensaio com tampa de teflon

Tubos de ensaio de vidro atóxico descartáveis

4.3. Outros materiais

Alças de inoculação

Bico de Bunsen

Blue rayon - BR (SIGMA)

Estantes

Filtros descartáveis para esterilização (MILLIPORE- 0,22 μ m)

Frascos Eppendorf (0,5 mL)

Lâmpada germicida (UV)

Luvas cirúrgicas

Máscara de proteção respiratória contra gases

Membranas filtrantes estéreis

Micropipetadores

Óculos de proteção

Papel de filtro

Papel alumínio

Parafilme

Pera de sucção

Pinças

Pipetas plásticas descartáveis

Placas de Petri descartáveis

Porta-pipetas de aço inoxidável

Protetor facial

Resina amberlite XAD-4 (SIGMA)

4.4. Reagentes

Acetato de etila (CARLO ERBA) P.A.

Ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) (CARLO ERBA) P.A.

Ácido clorídrico (HCl) P.A.

Ácido nítrico (HNO_3) P.A.

Ácido sulfúrico (H_2SO_4) P.A.

Álcool etílico

2 Aminoantraceno - 2AA (SIGMA)

Ampicilina (SIGMA)

Bacto ágar (DIFCO)

β - fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo - NADP (SIGMA)

D- Biotina (SIGMA)

Caldo de soja e triptona (MERCK)

Caldo nutriente nº 2 (OXOID)

Cloreto de magnésio - $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (VETEC) P.A.

Cloreto de potássio - KCl (MERCK) P.A.

Cloreto de sódio - NaCl (MERCK) P.A.

Cristal violeta (MERCK)

Diclorometano- DCM (BURDICK & JACKSON) P.A.

Dimetilsulfóxido - DMSO (SIGMA) P.A.

Éter etílico (SYNTH) P.A.

Fosfato de potássio dibásico - K_2HPO_4 (NUCLEAR) P.A.

Fosfato de sódio e amônio - $NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$ (Q.M.) P.A.

Fosfato de sódio dibásico - Na_2HPO_4 (CARLO ERBA) P.A.

Fosfato de sódio monobásico - NaH_2PO_4 (CARLO ERBA) P.A.

Fração S9 (MOLTOX INC.)

Glicose (MERCK)

D-Glicose 6-fosfato (SIGMA)

Hidróxido de sódio - NaOH (VETEC) P.A.

L-histidina HCl (SIGMA)

Metanol (MERCK) P.A.

4-Nitroquinolina-1-óxido (4NQO) (SIGMA)

Sulfato de magnésio - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (CARLO ERBA.) P.A.

4.5. Meios de cultura e soluções

1- Meio de Vogel Bonner:

É composto por 10g de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 100g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 175g de fosfato de sódio e amônio ($\text{NaH}_2\text{NH}_4\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 500g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) e 1litro de água destilada morna. Após esterilização o meio deve ser estabilizado a 55°C em banho maria.

2- Solução de glicose 10%:

20g de glicose são dissolvidos em 200mL de água destilada. Após esterilização o meio deve ser estabilizado a 55°C em banho-maria.

3- Solução de ágar:

15g de ágar são dissolvidos em 180mL de água destilada. Após esterilização o meio deve ser estabilizado a 55°C em banho-maria. Esta solução deve ser esterilizada por 30 minutos.

4- Solução de biotina e histidina 0,5mM

0,012g D-biotina e 0,011g de L-histidina são dissolvidos a quente em 100mL de água destilada. Após esterilização por autoclave , a solução deve ser estocada em refrigerador.

5- Ágar mínimo:

Este meio de cultura é composto por 200mL de solução de glicose 10%, 780mL de solução de ágar, 50mL de meio Vogel Bonner (50x) e 12mL de solução de biotina e histidina 0,5mM.

Os compostos são misturados assepticamente, e distribuídos em placas de Petri estéreis em volumes de 20mL.

6- Caldo nutriente:

25g do caldo nutriente são dissolvidos em 1 L de água destilada. Volumes de 30mL são distribuídos em frasco com tampa de rosca, e submetidos à esterilização em autoclave.

7- Ágar de superfície

6g de Bacto ágar e 5g de cloreto de sódio (NaCl) são dissolvidos em 1 L de água destilada. Volumes de 150 mL são distribuídos em frascos com tampa de rosca e submetidos a esterilização em autoclave.

8- Ágar Nutriente:

Este meio de cultura é composto de 25g de caldo nutriente, 15g de ágar e 1 litro de água destilada quente. Após a dissolução volumes de 25mL são distribuídos em placa de Petri estéril e descartáveis.

9- Solução de biotina 0,5mM

0,012g de D-biotina são dissolvidos a quente em 100mL de água destilada. A solução deve ser estocada em refrigerador após esterilização.

10- Solução de histidina 0,5%

0,5g de L-Histidina são dissolvidos a quente em 100mL de água destilada. A solução deve ser estocada em refrigerador após esterilização.

11- Solução de ampicilina:

0,08g de ampicilina são dissolvidos em 10mL de hidróxido de sódio 0,02N. A esterilização desta solução deve ser feita por membrana filtrante de 0,22 μ m (MILLIPORE) e armazenada em refrigerador em frasco escuro.

12- Mistura S9

Cada 100mL de mistura S9 é composto por: 4mL de fração S9, 1mL de solução cloreto de potássio (KCl) 0,4M, 1mL de solução cloreto de magnésio ($MgCl_2$) 1,65M, 0,5mL solução de glicose-6-fosfato 1M, 50mL de tampão fosfato 0,2M pH 7,4 e 39,5mL de água destilada. Esta solução deve ser preparada assepticamente, e mantida sob refrigeração mesmo durante seu uso. Após 3 horas a solução excedente deve ser descartada.

Fração S9

É preparada a partir de microssomas de células de fígado de rato, tratado com o indutor enzimático AROCLOR 1254 e separado por centrifugação a 9000g. Adquirida liofilizada e armazenada a -20°C.

Solução de sais (cloreto de magnésio($MgCl_2$) 0,4M:cloreto de potássio (KCl) 1,65M)

8,13g de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e 12,3g de cloreto de potássio (KCl) são dissolvidos em 100mL de água destilada. Após autoclavação a solução deve ser mantida em refrigerador.

Solução de glicose-6-fosfato1M:

Dissolver 2,821g de glicose-6-fosfato em 10mL de água destilada. Esta solução deve ser esterilizada por membrana filtrante de 0,22 μ m (MILLIPORE) e armazenada a -20°C.

Solução de NADP 0,1M:

0,7654g de NADP (β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) são dissolvidos em 10mL de água destilada. Esta solução deve ser esterilizada por membrana filtrante de 0,22 μ m (MILLIPORE) e armazenada a -20°C.

Tampão fosfato 0,2 M:

Solução A

2,84g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) são dissolvidos em 100mL água destilada.

Solução B

2,76g de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) são dissolvidos em 100mL água destilada.

81mL da solução A e 19mL da solução B, são misturados e o pH ajustando para 7,4 com a solução A ou B. Após esterilização em autoclave estocar o tampão em refrigerador.

13- Solução de 2-aminoantraceno (2AA):

0,005g de 2-aminoantraceno são dissolvidos em 20mL de dimetilsulfóxido usando equipamentos de proteção individual (EPI) adequado. A solução deve ser separada em alíquotas em pequenos frascos eppendorff para uso diário. A solução deve ser estocada a -20°C e sempre manipulada com cuidados especiais.

14- Solução de 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO):

0,001g de 4-nitroquinolina-1-óxido são dissolvidos em 20mL de dimetilsulfóxido usando equipamentos de proteção individual (EPI) adequado. A solução deve ser separada em alíquotas em pequenos frascos eppendorff para uso diário. A solução deve ser estocada a -20°C e sempre manipulada com cuidados especiais.

Enxaguar 8 a 10 vezes com água corrente e posteriormente uma vez com água ultrapura.

Secar o material de vidro em estufa a 170-180°C.

4.8. Amostragem, coleta, transporte e a armazenamento das amostras

Foram coletadas amostras de 120L de água bruta e 120L de água tratada, sendo que 60L de cada tipo de amostra foram concentrados pelo método padrão que utiliza XAD-4 com extração em pH natural da amostra e em pH ácido, e o restante pelo método teste que utiliza o Blue rayon.

As amostras de água bruta dos pontos selecionados foram coletadas o mais próximo possível do ponto de captação das estações de tratamento de água. As amostras de água tratada foram coletadas diretamente da torneira de água final das estações.

Foram utilizados para acondicionamento e transporte das amostras frascos de 20L de vidro lavados de acordo com o protocolo do nosso laboratório e seus gargalos foram cobertos com folha dupla de papel de alumínio, para evitar contaminação das amostras. Para a coleta da água bruta foi utilizado um balde de aço inoxidável, e posteriormente para transferência da água do corpo d'água para o frasco, todo o material foi enxaguado com a amostra, antes das coletas definitivas.

O transporte das amostras foi realizado em carro fechado, a temperatura ambiente, imediatamente após a coleta. As amostras foram armazenadas em câmara fria, anexa ao laboratório, à temperatura em torno de 4°C até o início do procedimento de concentração/extração das amostras.

O tempo médio de armazenamento entre a coleta e o início do processamento das amostras foi de três dias, assim nunca excedendo o máximo de 14 dias recomendado pelo Federal Register, 1979.

15- Solução de cristal violeta

0,01g de cristal violeta são dissolvidos em 10mL de água destilada.

A solução deve ser estocada à temperatura ambiente.

16- Ágar mínimo para preparo de placas master:

Proceder como descrito no item 5 substituindo a solução de biotina e histidina 0,5mM pelos compostos descritos na tabela.

Substâncias adicionadas aos meios de cultura

Substâncias	mg/litro
D-Biotina	0,66
L-Histidina	50,00
Ampicilina	25,20

4.6. Esterilização e teste de esterilidade

Para verificar a esterilidade dos meios de cultura, eles foram colocados em estufa a 37°C por pelo menos 12 horas. Se houvesse algum crescimento a placa era descartada.

Todos os meios de cultura e soluções utilizados neste trabalho foram esterilizadas em autoclave a 121°C (1 atm) por 20 minutos a não ser quando especificado.

A esterilização da vidraria utilizada foi feita em estufa a 180°C, por 2 horas.

Todas as placas de Petri e pipetas descartáveis utilizadas foram adquiridas previamente esterilizadas por radiação γ - cobalto.

4.7. Lavagem de vidraria

Todos os materiais utilizados dever ser descontaminados em autoclave a 121°C por 30 minutos e em seguida lavados com detergente neutro e enxaguados várias vezes. Após o enxágüe, o material deve ficar submerso em solução de ácido sulfúrico/ ácido nítrico 50% (6:1) por 8 horas.

4.8.1. Locais de amostragem

Foram selecionados dois pontos de coleta pertencentes à rede de monitoramento do programa de Monitoramento da Qualidade das Águas Superficiais do Estado de São Paulo coordenado pela CETESB. Ambos os locais servem estações de tratamento de água com diferentes processos de tratamento.

O ponto 1, ambiente lótico, recebe despejos provenientes de indústrias que utilizam corantes azóicos em seus processos e esgoto doméstico sem tratamento adequado.

O ponto 2 é um corpo d'água lântico com fontes difusas de contaminação, principalmente esgoto doméstico sem tratamento adequado.

4.9. Extração/concentração das amostras

4.9.1. XAD-4

Amberlite XAD-4 (Sigma) foi a resina utilizada como método de referência de extração. Esta resina é um polímero de caráter hidrofóbico denominado estireno-divinilbenzeno (DRESSLER, 1979).

A resina foi lavada antes de sua utilização para retirada de impurezas provenientes do seu processo de fabricação. Os procedimentos de lavagem baseiam-se nas recomendações de JUNK, et al., 1974 e PELLIZZARI, et al., 1984, com modificações. Inicialmente a resina foi lavada por três vezes com água ultrapura e três vezes com metanol de forma intercalada, depois colocada em Soxhlet com metanol por 48 horas. A resina limpa e pronta para o uso foi armazenada em frasco de vidro, em metanol, ao abrigo da luz.

Com a resina previamente lavada, foram preparadas as colunas para extração/concentração, sendo utilizadas colunas de vidro para cromatografia de 22mm/350mm, com placa porosa e com torneira de teflon, previamente lavadas e enxaguadas com metanol (Figura 2).

O volume de resina de cada coluna variou de acordo com o tipo e volume de amostra, seguindo a seguinte proporção: para a água bruta, 1mL de resina/L de amostra, e para amostras de água tratada 0,5mL de resina/L.

A extração por este método foi realizada em duas fases, sendo a primeira em pH natural da amostra (N) e em seguida a amostra era acidificada até pH inferior a 2 para ser realizada a extração ácida (H^+). Para a realização desta extração diferenciada a resina foi condicionada com solventes orgânicos de acordo com o pH de extração, e sua eluição também é diferenciada.

Para o condicionamento de uma coluna para a extração N a proporção e sequência de solventes utilizada foi 1mL de metanol/mL de resina, 1mL de éter etílico/mL de resina e 2mL de diclorometano/mL de resina. Para a eluição desta coluna a proporção e sequência de solventes foi 1mL de metanol/mL de resina e 4mL de diclorometano/mL de resina.

Para a extração H^+ a proporção e sequência de solventes foi 1mL de metanol/mL de resina, 1mL de éter etílico/mL de resina e 2mL de acetato de etila/mL de resina. Para eluição: 1mL de metanol/mL de resina e 4mL de acetato de etila /mL de resina foram utilizados.

Com as colunas montadas, os frascos contendo as amostras foram conectados através de tubos de vidro por um sistema de sifonagem. Todas as ligações foram feitas com fita de teflon. A amostra passou primeiramente através da coluna N num fluxo de aproximadamente 100mL por minuto e foi recolhida em frascos de 20L apropriadamente limpos. Após a acidificação o processo era repetido para a coluna H^+ , sendo a água final descartada.

Figura 2 – Passagem de amostra por coluna de XAD-4.

Após as eluições das colunas N e H⁺ os extratos obtidos foram levados ao evaporador rotatório, com banho de água quente a 40°C em balão de evaporação para retirada dos solventes. Os resíduos foram ressuspensos com os solventes de cada processo de eluição na proporção de 60L de amostra em 6mL de solventes, transferidos para ampolas de Kuderna e o volume equivalente a 40L de amostra transferido para tubo de ensaio com tampa com vedante de teflon, onde o solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio. As amostras secas foram encaminhadas para a realização do ensaio de mutagenicidade (teste de Ames). A figura 3 apresenta o esquema do método de extração com XAD-4.

Fig. 3 - Esquema da extração orgânica em resina XAD4

4.9.2. Blue rayon

A extração que utiliza o Blue rayon foi feita em etapa única, em pH natural da amostra não necessitando de condicionamento prévio. Porém antes do preparo de cada coluna, eram realizados testes de Ames para o controle das fibras de Blue rayon, visando assegurar que estas estivessem livres de compostos mutagênicos, já que o Blue rayon pode ser reutilizado após a lavagem, de acordo com o procedimento de lavagem descrito no item 4.10.

Para amostras de água bruta recomenda-se a utilização de Blue rayon na proporção de 1L de amostra/0,5g de Blue rayon e para água tratada a proporção amostra/Blue rayon foi padronizada em nosso laboratório como 2L de amostra /0,5g de Blue rayon. Para a eluição foi utilizada uma solução metanol/amônio 50:1 v/v como recomendado por SAKAMOTO & HAYATSU, 1990; e por HAYATSU, 1992 na proporção de 200mL/g de Blue rayon.

O Blue rayon aprovado pelo teste de controle no ensaio de mutagenicidade era acondicionado em colunas de vidro de 22mm/350mm, com placa porosa, e com torneira de teflon para cromatografia, de acordo com o tipo e o volume de amostra (OHE, et al., 1999b). A amostra foi passada pela coluna por um sistema de sifonagem, com fluxo de 50mL/minuto.

Após a passagem de toda a amostra pela coluna, o Blue rayon era retirado (Figura 4) e transferido para um becker, lavado com água ultrapura para retirar compostos não adsorvidos e sólidos suspensos que tenham sido retidos pelo BR. Após esta lavagem o BR era seco em papel de filtro para retirar o excesso de água e transferido para um erlenmeyer para eluição (SAKAMOTO & HAYATSU, 1990).

Figura 4 - Mechas de Blue rayon retiradas da coluna logo após passagem da amostra.

Neste erlenmeyer colocou-se a quinta parte do volume total adequado da solução de eluição (metanol/amônio), e o frasco levado ao agitador mecânico por 30 minutos a aproximadamente 120rpm, repetindo a operação cinco vezes.

Este extrato foi levado ao evaporador rotatório com banho de água quente a 40°C para retirada da solução de eluição. O resíduo obtido foi ressuscitado em 6mL de metanol e transferido para uma ampola de Kuderna. O volume equivalente a 40L foi transferido para um tubo de ensaio e o solvente evaporado sob fluxo de nitrogênio. Este resíduo foi ressuscitado com 6mL de diclorometano e novamente evaporado sob fluxo de nitrogênio. Após a completa retirada do solvente, as amostras foram submetidas ao teste de Ames. A Figura 5 ilustra o esquema de extração com o Blue rayon em coluna.

Fig. 5 - Esquema de extração com Blue Rayon em coluna

4.10. Procedimento de lavagem do Blue rayon

O Blue rayon pode ser reutilizado, porém não há descrição na literatura de como proceder sua lavagem. Desta forma, um procedimento foi padronizado e otimizado, composto pelas seguintes etapas:

1. Lavagem do Blue rayon em becker com água ultrapura usando bastão de vidro por 5min. O procedimento deve ser repetido quatro vezes.
2. O excesso de água deve ser removido com auxílio de papel filtro.
3. O Blue rayon deve ser imerso, em solução metanol/amônio (50:1 v/v), por 1 hora agitando-se em agitador mecânico, por duas vezes. O solvente deve ser descartado.
4. Imergir o Blue rayon em solução metanol/amônio (50:1 v/v) por uma noite.
5. Lavar o Blue rayon por imersão apenas com metanol por 1 hora agitando ocasionalmente. Coletar esta solução em balão de evaporação.
6. Secar em evaporador rotatório e usar o resíduo para realizar o ensaio controle.
7. Secar na capela todo o solvente residual e armazenar o Blue rayon em um becker coberto.
8. O Blue rayon pode ser mantido assim, ao abrigo da luz até a próxima utilização.

Decidiu-se que o critério de aceitação para sua reutilização era, que a análise controle de Blue rayon apresentasse resultado negativo para o teste de Ames.

4.11. Avaliação do desempenho do Blue rayon reutilizado

Foi realizado um teste de recuperação, comparando-se a XAD-4 com os Blue rayons utilizados durante o trabalho para verificar o desgaste sofrido, e avaliar quantas reutilizações seriam possíveis.

Em cinco litros de água ultrapura foram adicionados 100µg de 2-aminoantraceno (Figura 6), uma amina aromática com três anéis em sua molécula, dissolvida em 10mL de metanol.

Estas amostras adicionadas foram tratadas como amostras naturais e submetidas aos processos de extração e preparação dos extratos conforme descrito.

Foram testadas a eficiência da resina XAD-4 tanto para a extração natural quanto ácida, o BR1 com mais de 10 reutilizações tanto para amostras de água bruta quanto tratada, o BR2 com 7 reutilizações apenas para amostras de água bruta, o BR3 com 5 reutilizações apenas para amostras de água tratada e o BR4 nunca utilizado, apenas lavado e submetido ao teste de controle de BR.

A recuperação do 2-aminoantraceno foi analisada pelo teste de mutagenicidade, utilizando-se a linhagem de *S. typhimurium* TA98, na presença de ativação metabólica, condição necessária para detecção deste composto.

Figura 6 - Estrutura molecular do 2-aminoantraceno (2AA)

4.12. Teste de mutagenicidade – Teste de Ames

O teste de Ames foi realizado segundo MARON & AMES, 1983 e CETESB, 1993, com modificações.

O teste consiste em expor as linhagens teste auxotróficas para histidina (*his⁻*) a diferentes doses da amostra a ser avaliada em placas de ágar

mínimo suplementados com quantidade limitada de histidina e biotina, na presença e na ausência de um sistema de metabolização.

A presença de mutágenos na amostra é avaliada pela contagem do número de colônias das placas teste (revertentes espontâneos e induzidos) comparado ao número de colônias das placas de controle negativo (revertentes espontâneos).

4.12.1. Linhagens utilizadas

As linhagens de *Salmonella typhimurium*, TA98 e TA100, utilizadas neste estudo são derivadas da linhagem parental LT2. Foram desenvolvidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia e cedidas gentilmente.

A linhagem TA98 é auxotrófica para histidina, tem uma mutação no gene *hisD3052* que codifica para a enzima histidinol desidrogenase. Esta mutação é do tipo deslocamento do quadro de leitura e o alvo de reversão é o par C-G. Esta linhagem detecta mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA.

A linhagem TA100 é auxotrófica para histidina, tem uma mutação no gene *hisG46* que codifica para a primeira enzima da biossíntese da histidina. A mutação que ela contém é uma substituição no codon CTC (selvagem) para CCC (mutante), sendo portanto o alvo para reversão o par C-G. Esta linhagem detecta mutágenos que causam substituição de pares de base no DNA.

Ambas as linhagens contêm deleção *uvrB*, plasmídio pKM101 (Ap^r) e a mutação *rfa*.

A taxa de reversão espontânea para TA98 é de 25 a 75 revertentes/placa e da TA100 de 75 a 225 revertentes/placa (MARON & AMES, 1983).

Em nosso laboratório as taxas de reversão espontânea para as duas linhagens tendem a ser mais baixas (dados não publicados).

As linhagens utilizadas neste estudo foram continuamente testadas quanto à presença destas características, através da confecção de placas mãe.

4.12.2. Preparo da placa mãe

As linhagens de *Salmonella typhimurium* foram armazenadas permanentemente em freezer a -70°C, em ampolas com 0,9mL de cultura e 0,1mL de dimetilsulfóxido como agente crioprotetor.

As culturas para uso rotineiro foram mantidas em placas de ágar mínimo com biotina, histidina e ampicilina, em geladeira, denominadas “placas-mãe”.

As placas-mãe foram preparadas a cada dois meses e as características genéticas de cada cepa foram previamente avaliadas como descrito abaixo.

Uma alíquota de cultura permanente foi inoculada em 30mL de caldo nutriente e, após 16 horas de incubação sob agitação de 150 a 170 rpm, a cultura foi estriada em placas de ágar nutriente para isolamento de colônias.

Após incubação por cerca de 66 horas a 37°C, foram escolhidas ao acaso 5 colônias isoladas de cada linhagem, e estas, inoculadas em 5mL de caldo nutriente, uma a uma.

Após incubação sob agitação a 37°C, inoculou-se cada cultura na forma de estrias grossas em placas de ágar mínimo suplementado com biotina, histidina e ampicilina, e após incubação, as placas foram seladas com parafilme e mantidas sob refrigeração.

Cada cultura crescida nos 5mL de caldo nutriente foi também inoculada através de “swab” esterilizados, em placas de ágar nutriente para verificação da presença da mutação *rfa*, do plasmídio pKM101 e da deleção de *uvrB*.

Mutação *rfa*

Colocou-se discos de papel de filtro de 5mm de diâmetro embebido com 10µl de solução cristal violeta 1% no centro da placa de ágar nutriente inoculada. Após incubação, as linhagens contendo esta mutação apresentavam um halo de inibição de no mínimo 14mm ao redor do disco.

Plasmídio pKm101

Com auxílio de uma alça de inoculação foi aplicado cinco linhas de solução de ampicilina 8 mg/mL na placa de ágar nutriente inoculada. Após secar a linhagem a ser testada foi estriada sobre a linha de antibiótico. Após incubação, as linhagens contendo esta mutação não apresentavam crescimento sobre a linha de antibiótico.

Deleção *uvrB*

Metade de uma placa de ágar nutriente inoculada foi coberta com cartolina e irradiada com lâmpada germicida (ultravioleta 245nm) de 15 watts a uma distância de 33cm, por 15 segundos.

Após incubação, verificou-se que as linhagens mutantes cresceriam apenas na parte não irradiada (coberta) da placa.

4.12.3. Taxa de reversão espontânea

A taxa de reversão espontânea foi avaliada inoculando-se 100µl de cada cultura em 2,5mL de ágar de superfície mantido em banho-seco a 45°C, e vertendo-se a mistura, após homogeneização, sobre uma placa de ágar mínimo. Cada cultura foi inoculada em duplicata.

A taxa de reversão espontânea foi avaliada após 48 horas de incubação a 37°C e deveria estar dentro da faixa esperada para cada cepa.

Das 5 culturas analisadas de cada linhagem foram escolhidas duas com características genéticas adequadas, e delas, foram preparadas

culturas permanentes. As placas master correspondentes foram usadas como inóculo durante os ensaios, pelo período de 2 meses.

4.12.4. Procedimento do ensaio

As culturas das cepas TA98 e TA100 foram inoculadas com alça da platina em 30mL de caldo nutriente, utilizando-se as placas master como fonte de inóculo. Após crescimento, por uma noite, a 37°C sob agitação mecânica as culturas foram mantidas sob refrigeração até o momento do teste.

Aos tubos de ensaio, contendo 2 ou 3mL de ágar de superfície, previamente fundido e mantido a 45°C em banho seco, foram adicionados volumes de 100, 50 e 25µl do extrato correspondendo a diferentes doses equivalentes da amostra, 100µl de cultura de cada linhagem (10^9 células/mL) e para o ensaio na presença de ativação metabólica, 500µl da mistura S9. Após homogeneização em agitador tipo "vortex", o conteúdo do tubo foi vertido em placas de ágar mínimo. A cada ensaio, todas as doses e controles foram testadas em triplicata.

As placas foram incubadas por 66 horas a 37°C.

Paralelamente a cada ensaio foi feito o controle negativo, inoculando-se 400µl do extrato de DMSO, também em triplicata.

Também foi feito o controle positivo do ensaio utilizando-se substâncias mutagênicas conhecidas, 4NQO e 2-aminoantraceno nas concentrações de 0,5µg e 2,5µg/placa na presença e ausência de S9 respectivamente para as linhagens TA98 e TA100.

O número de revertentes por placa foi então avaliado utilizando-se um contador automático de colônias AccuCount 1000, BioLogics. A Figura 7 ilustra o procedimento do teste de Ames.

Fig. 7 - Esquema do Teste de Ames

4.12.5. Interpretação de resultados e análises estatísticas

O número de revertentes por placa em uma cultura do teste de Ames com o controle negativo, é a taxa de reversão espontânea esperada nas condições do ensaio. Ao tratarmos essa mesma cultura com doses crescentes de um agente ou mistura de compostos com atividade mutagênica, o número de revertentes por placa aumenta, proporcionalmente ao aumento das doses de exposição, até um platô, aonde as doses aplicadas são letais para as células por causarem excesso de danos ao DNA ou, pela ação de outros compostos tóxicos presentes na amostra.

Espera-se portanto uma relação dose resposta entre o número de revertentes por placa e as doses de uma amostra com atividade mutagênica. Como a amostra utilizada nos experimentos é uma mistura complexa, poderá conter além de mutágenos, compostos que sejam tóxicos por outras vias, comprometendo em alguns casos a linearidade dessa relação.

Deve-se fazer uma análise estatística dos resultados, o que compreende uma análise de Variância (ANOVA) para avaliação das diferenças entre doses e entre repetições, seguida de uma análise de regressão linear. A potência da amostra é expressa pela inclinação da parte linear da curva dose-resposta. São várias as formas de expressão dos resultados, porém a inclinação da reta é sempre proporcional à potência da amostra. Em geral, diferenças significativas entre doses testadas e o controle negativo, e relação dose-resposta comprovadas estatisticamente indicam atividade genotóxica da amostra, porém cada ensaio tem seu critério específico, normalmente baseado na sua reprodutibilidade e características intrínsecas das linhagens teste.

A razão de mutagenicidade (RM) foi calculada para cada dose analisada, e é a média do número de revertentes na placa teste (espontâneos e induzidos) dividido pela média do número de revertentes por placa do controle negativo (espontâneos) (Figura 8).

Considerou-se uma amostra como positiva quando a razão de mutagenicidade (RM) foi maior ou igual a 2 em pelo menos uma das doses do ensaio e houve efeito dose resposta, com diferença significativa entre

pelo menos uma dose testada e o controle . Quando o RM apresentou valores entre 1,5 e 2,0 e houve efeito dose resposta com diferença significativa entre pelo menos uma das doses testadas e o controle considerou-se que a amostra apresentava indícios de mutagenicidade, conforme critério adotado por McGEORGE, et al., 1985 e VALENT, 1990.

Para as análises de variância e ajuste dos dados, utilizou-se o programa denominado SALANAL, elaborado por MYERS do Integrated Laboratory Systems, Carolina do Norte, EUA, e por ele também gentilmente cedido.

A regressão linear foi avaliada utilizando uma variação do modelo linear, denominado truncagem tipo Bernstein (BERNSTEIN, et al., 1982), que consiste na retirada de uma ou mais doses da análise usando somente os resultados que representam a porção linear da curva dose resposta.

Figura 8 – Placas de ágar mínimo com colônias *his*⁺ da linhagem TA98 de *Salmonella typhimurium*. Placa à esquerda: revertentes espontâneos. Placa à direita: revertentes espontâneos e induzidos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Serão apresentados e discutidos os resultados dos experimentos realizados durante este trabalho.

5.1. Eficiência da lavagem do Blue rayon

O Blue rayon é uma fibra adsorvente que pode ser reutilizada de acordo com HAYATSU, 1992, e para isso é necessário que este esteja isento de substâncias químicas que possam interferir de qualquer forma no teste de Ames.

Um protocolo simples nos foi enviado pelo Dr. T. Ohe, da Universidade de Kyoto no Japão (Comunicação pessoal, 1999). Baseado neste procedimento, um protocolo para lavagem foi desenvolvido, conforme descrito em Materiais e métodos, item 4.10. Sua eficiência foi avaliada através da realização de testes de Ames em dose única máxima de 0,5g de BR/placa, nas condições usuais do teste.

Foram realizadas modificações no protocolo original pois este não estava sendo efetivo para a remoção dos compostos mutagênicos levando a interferências no teste de Ames, não atendendo ao objetivo do trabalho.

A Tabela 1 apresenta os resultados dos testes de Ames para controle da eficiência de lavagem do Blue rayon .

Tabela 1- Eficiência do processo de lavagem do Blue rayon quanto a ausência de compostos genotóxicos frente ao teste de Ames .

Controle negativo do Blue rayon (BR)	Datas	Razão de mutagenicidade(RM)			
		TA98		TA100	
		- S9	+S9	- S9	+ S9
BR- 1	10/11/00	1,2	1,2	1,4	1,5
	29/11/00	0,8	1,0	1,1	1,1
	09/02/01	1,9	0,8	0,8	1,0
	04/05/01	1,0	0,8	1,0	1,0
BR- 2	10/11/00	1,2	1,4	1,2	1,3
	14/12/00	1,0	0,9	1,2	1,2
	20/02/01	1,5	0,9	1,0	1,1
	04/05/01	1,0	1,0	1,1	0,9
BR- 3	10/11/00	-	0,9	1,0	1,2
	14/12/00	1,1	1,0	0,8	1,0
	09/02/01	1,6	1,0	1,2	1,3
	04/05/01	0,9	1,0	1,1	1,0
BR- 4	18/01/01	0,9	1,0	1,1	1,1
	20/02/01	0,9	1,1	1,0	1,1
	15/05/01	0,9	1,3	1,0	1,0

Razão de mutagenicidade(RM): nº de revertentes na placa teste/ nº de revertentes do controle negativo
 $RM \geq 2$ indica presença de atividade mutagênica nos extratos.

Todos os lotes avaliados neste ensaio eram compostos por 15g de Blue rayon.

Os resultados com RM maior ou igual a 2 são considerados positivos, conforme critério definido no item 4.12.5. Quando os resultados obtido para o teste de Ames apresentaram RM maior ou igual a 1,5 este resultado foi considerado como indícios de mutagenicidade, sendo necessária nova lavagem.

Os Blue rayons 1 e 3 apresentaram indícios de mutagenicidade em um dos procedimentos de lavagem, sendo submetidos a uma nova lavagem e novo teste controle do Blue rayon. Após repetição da lavagem estes apresentaram resultados negativos e foram liberados para reutilização.

O procedimento de lavagem foi testado e otimizado, e todos os demais resultados obtidos foram negativos após a primeira lavagem, demonstrando que este foi eficiente para o propósito deste trabalho.

Porém com as reutilizações foi observada a perda de pigmento sofrida por todos os lotes de Blue rayon, com mais intensidade naqueles utilizados para extração de amostras de água tratada, como observado também por HAYATSU, 1992.

5.2. Avaliação do desempenho do Blue rayon – Ensaio utilizando 2-aminoantraceno (2AA)

Este ensaio foi realizado para avaliar o desempenho do Blue rayon novo e reutilizado em relação ao método com XAD-4, e estimar o número de ciclos de uso e lavagem que estes suportam sem perder as suas características de desempenho originais.

Para tanto foi utilizado o 2-aminoantraceno (2AA), que é um dos compostos utilizados como controle positivo para o teste de Ames. No trabalho de revisão publicado por HAYATSU, 1992, foram avaliados 62 compostos quanto a recuperação pelo Blue cotton, entre estes estão compostos com estrutura molecular contendo 3 ou mais anéis, 2 anéis e 1 anel, sendo que no referido estudo o 2AA apresentou uma recuperação de aproximadamente 80%.

Este estudo demonstra também que os compostos com 1 ou 2 anéis em sua molécula são pouco ou não adsorvidos pelo tiosulfato de cobre ftalocianina, substância adsorvente do Blue rayon.

O 2AA foi escolhido por ser uma amina aromática policíclica, semelhante aos compostos suspeitos por serem responsáveis pela atividade mutagênica presente no ponto 1 de amostragem, devido ao tipo de efluentes industriais que este recebe.

No trabalho de VALENT, 1990, a água bruta de um corpo d'água que recebe efluentes do mesmo tipo de indústrias que lançam seus efluentes no ponto 1, teve comportamento com os extratos obtidos com a resina XAD-4 muito semelhantes aos extratos obtidos neste trabalho para as linhagens testadas.

Apenas a linhagem TA98 na presença de ativação metabólica foi utilizada porque o 2-aminoantraceno é detectado preferencialmente nesta condição. A Tabela 2 e a Figura 9 apresentam os resultados obtidos neste ensaio.

Tabela 2- Resultados do teste de Ames para os extratos contendo 2AA obtidos tanto por XAD-4 como pelo Blue rayon com diferente número de reutilizações.

Concentração de 2AA	Revertentes por placa					
	TA98+S9					
Doses (μg)	XAD-4		BR1 ⁽¹⁾	BR2 ⁽²⁾	BR3 ⁽³⁾	BR4 ⁽⁴⁾
	N	H ⁺				
0	29,5	29,5	29,5	29,5	29,5	29,5
0,15	104,6	26,6	150,0	126,0	104,3	195,6
0,30	226,6	24,0	286,3	222,3	217,6	390,6
0,67	691,6	25,0	694,6	602,6	506,3	889,6
1,25	1236,6	28,3	1331,6	1149,3	1060,6	1509,3
2,50	1534,0	47,6	1616,0	2020,0	1608,3	1652,0
5,00	1578,0	77,0	1537,3	2009,0	1876,0	1341,0

(1) mais de 10 reutilizações – águas brutas e tratadas

(2) 7 reutilizações – apenas águas brutas

(3) 5 reutilizações – apenas águas tratadas

(4) novo

Os desempenhos do Blue rayon novo e dos reutilizados foram muito semelhantes entre si e também quando comparados ao da XAD-4. Porém, quando utilizado para extração de amostras de água tratada seu desgaste é mais rápido, permitindo menor número de reutilizações.

De acordo com HAYATSU, 1992, a água tratada diminui a vida útil do Blue rayon devido ao ataque sofrido pelo ftalocianina de cobre tiosulfato pelo cloro livre, o que pode ser observado pela perda de coloração do mesmo.

Sugere-se que após quatro reutilizações com amostras de água tratada este deva ser descartado, pois, observando a Figura 9, podemos verificar que apesar de pouca diferença entre os extratos o BR3 é o que apresentou valores de atividade mutagênica mais baixos para as quatro primeiras dose testadas.

O resultado obtido com o BR2 demonstra, que quando utilizado apenas para extração de amostras de água bruta o Blue rayon permite varias reutilizações sem apresentar desgaste aparente.

Figura 9 – Representação gráfica dos resultados de fortificação das amostras com 2AA, extraídas com XAD e fibras de Blue rayon com diferentes ciclos de reutilização.

Como observado na Figura 9, o extrato ácido obtido com a resina XAD-4 recuperou baixíssima atividade mutagênica provavelmente devido à alta afinidade do 2AA à XAD-4 no pH natural da amostra. Porém, para avaliar com precisão a recuperação do 2AA ou de qualquer outro composto de interesse, é necessária a realização de análises químicas que quantifiquem os compostos presentes no extrato obtido.

O Blue rayon, no entanto, no que se refere à recuperação avaliada através da detecção da atividade mutagênica, mostrou-se eficiente e compatível com a resina XAD-4 para estes compostos, tanto para os lotes de Blue rayon novos (com maior eficiência) como reutilizados.

5.3. Resultados obtidos com teste de Ames para as amostras de água bruta e tratada analisadas dos pontos de amostragem

Todas as amostras foram analisadas com as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 na ausência e na presença de ativação metabólica como descrito no item 4.12, visando a detecção do maior número e quantidade, possível de compostos genotóxicos presentes na amostra, pois como descrito por SCHENCK, et al., 1998, nestas condições são detectados 90% dos compostos genotóxicos daqueles detectados pelo teste de Ames.

Para amostras de água bruta do Estado de São Paulo, o resultado esperado para o teste de Ames é negativo, como demonstrado no trabalho de UMBUZEIRO. et al., 2001, que compila resultados dos últimos 20 anos, do programa de monitoramento da qualidade das águas que a CETESB realiza.

Durante esse período, 1007 amostras de águas superficiais foram analisadas frente ao teste de Ames, dentre as quais apenas 14% (137 amostras) apresentaram resultados positivos, para as linhagens testadas.

Dos 14% de amostras positivas, 79% foram detectadas pela linhagem TA98, observando-se, como resultados, maior número de revertentes induzidos na ausência de ativação metabólica, os quais sugerem presença em maior quantidade, nestas amostras, de mutágenos diretos.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos da amostra de água bruta submetida à extração com Blue rayon do ponto 1, primeira campanha.

Tabela 3- Resultados do teste de Ames para as linhagens TA98 e TA100 com e sem mistura S9 para a amostra de água bruta do ponto 1 na campanha de novembro de 2000. Método de extração, Blue rayon.

Ponto1 Campanha1	revertentes por placa											
	TA98						TA100					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
Dose (ml equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	22,4	4,56	-	21,0	1,41	-	69,6	9,71	-	91,4	8,76	-
67,5	35,0	2,83*	1,6	29,5	4,95	1,4	67,0	21,21	0,9	75,5	14,85	0,8
125	33,0	8,49	1,5	29,5	3,54*	1,4	67,0	1,41	0,9	101,5	9,19	1,1
250	40,5	0,71**	1,8	-	-	-	73,0	11,31	1,1	88,0	0,00	0,9
500	53,0	2,83**	2,4	-	-	-	79,0	9,91	1,1	89,5	2,12	0,9
1250	54,0	2,83**	2,4	70,5	4,95**	3,5	114,5	6,36**	1,7	82,0	0,00	0,9
Contr. Posit.	161,5	2,12	7,2	1113	63,64	53	412,0	46,67	5,9	1470,0	32,57	16,1
Resultado rev/L	64 (41 - 82)			40 (34 - 46)			35 (18 - 51)			ND		

DP – desvio padrão RM – razão de mutagenicidade ND – mutagenicidade não detectada ANOVA * p<0.05 ** p<0.01

Foi observada atividade mutagênica na amostra de água bruta do ponto 1 com a linhagem TA98 na ausência e presença de mistura S9, com valores de 64 e 40 revertentes/L, respectivamente, e indícios de mutagenicidade para a linhagem TA100 na ausência de mistura S9, com valor de 35 revertentes/L.

Este resultado foi o esperado por se tratar de um local contaminado com compostos policíclicos, provavelmente do grupo das arilaminas que são principalmente detectadas pela linhagem TA98, e pela seletividade do Blue rayon para esta classe de compostos. A suspeita da presença destes compostos é pertinente devido ao tipo de efluentes industriais lançados no corpo d'água, a jusante do ponto 1, onde esta amostra foi coletada.

KUSAMRAN, et al., 1994, utilizaram o Blue rayon para extrair compostos genotóxicos das águas dos rios Chao Phraya em Bangkok e Sumida e Ara em Tóquio e não detectaram atividade mutagênica significativa para as linhagens TA98 e 100, na ausência e presença de mistura S9. No entanto, com as linhagens YG1024, sensível a amins aromáticas e YG1029, sensível a

nitrocompostos, pois têm atividade aumentada das enzimas *o*-acetiltransferase e nitroredutase, respectivamente, os autores obtiveram resultados significativos para atividade mutagênica, na ausência e presença de mistura S9, sugerindo a presença de aminas aromáticas.

OHE, 1997, utilizando o método de Blue rayon *in situ*, identificou quatro aminas heterocíclicas a 2-amino-3,8-dimetilimidazol[4,5-*f*] quinoxalina (MeIQx), 3-amino-1,4-dimetil-5*H*-pirido[4,3-*b*]indol (Trp-P-1), 3-amino-1-metil-5*H*-pirido[4,3-*b*]indol (Trp-P-2) e 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5-*b*]piridina responsáveis por grande parte da mutagenicidade detectada pela linhagem de *S.typhimurium* NM2009, que também apresenta atividade aumentada da enzima *o*-acetiltransferase, com ativação metabólica.

NUKAYA, et al., 1997, identificaram a arilamina 2-[2-(acetilamino)-4-[bis(2-metoxietil)amino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2*H*-benzotriazol (PBTA-1), capaz de induzir 1.200.000 revertentes/ μ g para a linhagem YG1024, na presença de mistura S9.

Com outra fração do extrato obtido no trabalho de NUKAYA, et al., 1997, OGURI, et al., 1998, identificaram o 2-[2-(acetilamino)-4-[*N*-(2-cianoetil)etilamino]-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2*H*-benzotriazol (PBTA-2), que foi capaz de induzir 9.300 e 3.200.000 revertentes/ μ g para as linhagens TA98 e YG1024, respectivamente, na presença de mistura S9.

OTSU, et al., 1998, detectaram atividade mutagênica em extratos obtidos com Blue rayon em águas de rios com linhagem TA98 em presença de mistura S9 com valor de 2082 revertentes/placa.

KATAOKA, et al., 2000, identificaram três aminas heterocíclicas responsáveis por 26% da atividade mutagênica total detectada pela linhagem TA98, em presença de mistura S9, como sendo 2-amino-3-metilimidazol-[4,5-*f*]quinolina (IQ), 3-amino-1,4-dimetil-5*H*-pirido[4,3-*b*]indol (Trp-P-1) e 2-amino-9*H*-pirido[2,3-*b*]indol (A α C).

NUKAYA, et al., 2001, identificaram outra amina presente nos extratos obtidos com o Blue rayon do seu trabalho de 1997, a 2-[2-(acetilamino)-4-

amino-5-metoxifetil]-5-amino-5-amino-7-bromo-4-cloro-2H-benzotriazol (PBTA-4), capaz de induzir 190.000 e 7.800.000 revertentes/ μ g para as linhagens TA98 e YG1024, em presença de mistura S9, respectivamente.

Todos os trabalhos acima citados que detectaram atividade mutagênica em água bruta obtiveram seus resultados na presença de ativação metabólica com a linhagem TA98 e/ou com a linhagem de YG1024, que é derivada da linhagem TA98, onde se inseriu o plasmídio pYG219, com o gene da enzima *o*-acetiltransferase que a torna muito mais sensível a amins aromáticas.

Baseado nestes dados podemos sugerir que, se testássemos as amostras avaliadas no nosso trabalho com a linhagem YG1024, poderíamos verificar se a atividade mutagênica observada é devida à presença de amins aromáticas o que confirmaria nossa suspeita.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos da amostra de água tratada submetida a extração com Blue rayon do ponto 1, primeira campanha.

Tabela 4- Resultados do teste de Ames para as linhagens TA98 e TA100 com e sem mistura S9 para a amostra de água tratada do ponto 1 na campanha de novembro de 2000. Método de extração, Blue rayon.

Ponto1 Campanha 1	revertentes por placa											
	TA98						TA100					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
Dose (ml equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	27,3	2,08	-	27,0	4,06	-	146,6	8,79	-	108,8	8,73	-
250	31,7	3,79	1,2	27,7	4,16	1,0	130,7	5,51	0,9	133,3	12,10	1,2
500	33,3	4,51	1,2	36,7	1,53*	1,4	129,3	8,08	0,9	131,3	7,77	1,2
1000	46,3	7,77*	1,7	37,7	9,61	1,4	129,0	8,54	0,9	137,3	16,26	1,3
1500	48,7	9,45*	1,8	45,0	6,24*	1,7	131,3	11,50	0,9	123,3	8,08	1,1
Contr. Posit.	150,0	18,38	5,5	638,0	131,52	26,3	826,5	6,36	5,6	1647,5	3,53	15,1
Resultado rev/L	15 (10 – 20)			12 (8 – 16)			ND			ND		

DP – desvio padrão RM – razão de mutagenicidade ND – mutagenicidade não detectada ANOVA * p<0.05 ** p<0.01

Na amostra correspondente de água tratada foi observado apenas indícios de mutagenicidade para a linhagem TA98, na ausência e presença de mistura S9, com valores de 15 e 12 revertentes/L, respectivamente. Esse

resultado sugere que houve passagem dos contaminantes da água bruta para a água tratada.

STOPPE, et al., 1998; e SCHENCK et al., 1998, demonstraram que águas tratadas obtidas de águas brutas isentas de atividade mutagênica podem apresentar esta atividade devido à formação de compostos genotóxicos durante o processo de cloração pela reação de ácidos húmicos com o cloro livre. Estes compostos formados são usualmente detectados pelas linhagens TA98 e TA100 na ausência de ativação metabólica por se tratarem de compostos genotóxicos diretos.

VARTIAINEN, et al., 1987, concluíram que o Blue rayon não é capaz de adsorver os compostos gerados pela cloração e detectados pela TA100 na ausência de mistura S9, que são preferencialmente adsorvidos em pH ácido pela resina XAD-4 e XAD-8.

Pelo comportamento das linhagens perante os contaminantes recuperados no extrato desta amostra obtido com o Blue rayon, e pelos dados dos trabalhos citados, podemos sugerir que a atividade genotóxica detectada, ainda que menor do que a detectada no extrato obtido a partir da água bruta, seja referente aos compostos presentes na água bruta e que não foram removidos adequadamente pelo tratamento d'água.

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos da amostra de água bruta do ponto 1, primeira campanha, submetida a extração com XAD-4.

Tabela 5- Resultados do teste de Ames para as linhagens TA98 e TA100 com e sem mistura S9 para a amostra de água bruta do ponto 1 na campanha de novembro de 2000. Método de extração, XAD-4.

Ponto1 Campanha1	revertentes por placa											
	TA98											
	N						H+					
Dose (mg equiv.)	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	22,4	4,56	-	27,0	4,06	-	27,3	2,08	-	27,0	4,06	-
250	37,0	8,54	1,6	51,7	6,11**	1,9	61,0	7,00**	2,2	68,7	7,64**	2,5
500	31,3	4,93	1,4	65,3	6,03**	2,4	84,0	12,77**	3,1	99,7	12,22**	3,7
1000	41,3	6,66*	1,8	98,7	8,96**	3,6	92,7	10,97**	3,4	124,3	11,59**	4,6
1500	46,0	1,73**	2,1	106,5	2,12**	3,9	92,3	9,81*	3,4	106,7	9,61**	3,9
Contr. Posit.	161,5	2,12	7,2	1113,0	63,64	41,2	161,5	2,12	7,2	1113,0	63,64	41,2
Resultado rev/L	16 (11 – 20)			74 (66 - 83)			118 (98 – 138)			151 (131 – 171)		

Dose (mg equiv.)	TA100											
	N						H+					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	146,6	8,79	-	108,8	8,73	-	146,6	8,79	-	108,8	8,73	-
250	130,0	1,00	0,9	149,3	1,15**	1,4	124,5	27,58	0,8	136,7	19,22	1,2
500	161,0	25,53	1,1	151,3	24,99	1,4	110,5	20,51	0,7	167,3	9,61**	1,5
1000	152,0	25,46	1,0	174,3	10,69**	1,6	113,0	11,53	0,7	188,0	19,80**	1,7
1500	196,7	21,20*	1,3	266,3	75,87*	2,4	119,3	12,50	0,8	141,3	23,54	1,3
Contr. Posit.	412,0	46,47	2,8	1470,0	32,57	13,5	412,0	46,47	2,8	1470,0	32,57	13,5
Resultado rev/L	ND			87 (64 – 109)			ND			89 (64 – 113)		

DP - desvio padrão

RM - razão de mutagenidade

ANOVA* p<0,05

** p<0,01

Para a amostra de água bruta do mesmo ponto e mesma campanha, submetida ao método de extração por XAD-4 foi detectada mutagenicidade

para a linhagem TA98 na ausência e presença de S9 em ambos extratos natural e ácido. E para a linhagem TA100, a amostra apresentou mutagenicidade para o extrato natural na presença de mistura S9 e indícios de mutagenicidade no extrato ácido na presença de mistura S9.

Na mesma amostra submetida a extração com Blue rayon o comportamento para a linhagem TA98 foi o mesmo, com resultados de atividade mutagênica mais baixos, o que pode ser justificado pela seletividade do Blue rayon. Os valores de atividade mutagênica elevados detectados pela XAD-4 sugerem a presença não apenas de compostos policíclicos genotóxicos, mas também de outras classes de compostos com diferentes estruturas moleculares, também genotóxicos, mas que o Blue rayon não é capaz de adsorver.

OHE, 1996, comparou extratos obtidos com XAD-2 e Blue rayon para amostras de águas brutas do Rio Yodo quanto a mutagenicidade perante as linhagens NM2009 e 2000 na ausência e na presença de ativação metabólica. Este trabalho relata a diferente atividade mutagênica induzida pelos extratos obtidos com Blue rayon e os obtidos com XAD-2.

SAKAMOTO, et al., 1996, concluíram em seu trabalho que as colunas de Blue chitin são mais eficientes que a XAD-2 para a detecção de mutagenicidade com a TA98 com mistura S9 e que o método do Blue rayon *in situ* é o mais sensível e conveniente entre os métodos analisados.

As diferenças entre os extratos obtidos com Blue rayon e XAD-4 também são observadas em nosso trabalho, porém sem análises químicas que elucidem a composição química dos nossos extratos, achamos conveniente sugerir que estes dois métodos sejam usados como métodos complementares.

Essa combinação auxiliaria a caracterização química a ser realizada pois direcionaria as classes de compostos possivelmente presentes nos extratos obtidos das amostras.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos da amostra de água tratada submetida a extração com XAD-4 do ponto 1 para a primeira campanha.

Tabela 6-Resultados do teste de Ames para as linhagens TA98 e TA100 com e sem mistura S9 para a amostra de água tratada do ponto 1 na campanha de novembro de 2000. Método de extração, XAD-4.

Ponto1 Campanha1	revertentes por placa											
	TA98											
	N						H+					
Dose (mg equiv.)	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	24,8	0,84	-	28,4	2,41	-	27,3	2,08	-	27,0	4,06	-
250	53,3	7,51**	2,1	46,7	10,12	1,6	-	-	-	-	-	-
500	68,0	0,00	2,7	45,0	7,00*	1,6	-	-	-	-	-	-
1000	84,3	9,50**	3,4	56,7	12,06*	1,9	154,0	5,66**	5,6	78,5	9,19**	2,9
1500	91,5	16,26**	3,7	66,7	11,59**	2,4	193,0	39,66*	7,1	123,5	7,78**	4,6
Contr. Posit.	135,8	27,73	5,5	787,6	120,45	27,7	135,8	27,73	5,5	787,6	120,45	27,73
Resultado rev/l	100 (79 – 120)			26 (20 – 32)			117 (99 – 139)			58 (50 – 67)		

Exp. 2	TA98											
	N						H+					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
Dose (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	Não Realizado			Não Realizado			24,8	0,84	-	28,4	2,41	-
250							55,7	6,11	2,2	39,3	8,02	1,4
500							95,3	6,03	3,8	58,7	13,05	2,1
1000							132,0	7,07	5,3	82,5	14,85	2,9
1500							188,0	0,00	7,6	107,0	0,00	3,8
Contr. Posit.	-	-	-	-	-	-	162,5	43,13	6,6	918,0	65,05	32,2
Resultado ver/L	-			-			135 (125 – 146)			54 (43 – 66)		

Cont. Tabela 6

Dose (mg equiv.)	TA100											
	N						H+					
	S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	146,6	8,79	1,0	108,8	8,73	1,0	105,0	0,00	-	104,0	0,00	-
250	-	-	-	-	-	-	134,0	18,38	2,3	113,0	30,14	1,1
500	-	-	-	-	-	-	183,7	14,01	1,7	138,0	3,21	1,3
1000	135,5	16,26	0,9	119,5	3,54	1,1	220,5	27,58	2,1	145,0	21,21	1,4
1500	131,0	2,83	0,9	130,5	10,61	1,2	315,0	0,00	3,0	177,0	0,00	1,7
Contr. Posit.	416,4	84,99	2,84	1276,5	381,39	11,7	364,0	0,00	3,5	941,5	7,78	9,1
Resultado rev/L	ND			ND			130 (96 – 163)			ND		
Exp. 2												
	N						H+					
Dose (mg equiv.)	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	105,0	0,00	-	104,0	0,00	-	Não Realizado			Não Realizado		
250	117,0	0,00	1,1	98,5	30,41	0,9						
500	135,0	38,50	1,3	130,0	0,00	1,3						
1000	-	-	-	-	-	-						
1500	177,0	0,00	1,7	127,0	18,38	1,2						
Contr. Posit.	390,5	5,66	3,7	998,0	0,00	9,6	-	-	-	-	-	-
Resultado rev/L	ND			ND			-			-		
DP - desvio padrão RM - razão de mutagenicidade ANOVA * p<0,05 ** p<0,01												

DP - desvio padrão

RM - razão de mutagenicidade

ANOVA * p<0,05

** p<0,01

O extrato obtido com XAD-4 para amostra de água tratada do mesmo ponto e mesma campanha apresentou atividade mutagênica para a linhagem TA98 em ambos os extratos natural e ácido, na ausência e na presença de ativação metabólica. Isso reforça a sugestão de que o tratamento não foi capaz de remover toda a atividade mutagênica presente na água bruta do mesmo ponto e mesma coleta, tal como já observado com o uso do Blue rayon. Este comportamento para a linhagem TA98 não é típico de produtos gerados pela cloração, como descrito por STOPPE, et al., 1998; e por SCHENCK et al., 1998,

estes apresentam atividade mutagênica para a TA98 somente na ausência de mistura S9.

Para a linhagem TA100 a atividade mutagênica presente na água bruta foi eliminada pelo tratamento, porém o mesmo gerou produtos com atividade mutagênica detectada agora pela TA100 na ausência de mistura S9 e recuperados apenas na extração ácida, resposta característica de águas tratadas com cloro (MEIER, 1990; SCHENK, et al., 1998).

As repetições foram realizadas por motivo de contaminação microbiana do ensaio.

A segunda campanha teve início em abril de 2001 sendo que a coleta no ponto 1 ocorreu no mês de maio do mesmo ano.

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para a amostra de água bruta submetida a extração com Blue rayon do ponto 1 para a segunda campanha.

Tabela 7- Resultados do teste de Ames para as linhagens TA98 e TA100 com e sem mistura S9 para a amostra de água bruta do ponto 1 na campanha de maio de 2001. Método de extração, Blue rayon.

Ponto1	revertentes por placa											
Campanha2	TA98						TA100					
Dose (ml equiv.)	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	32,8	5,02	-	27,0	3,27	-	111,2	10,43	-	109,2	10,03	-
50	-	-	-	27,7	4,93	1,0	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	33,0	3,46	1,2	-	-	-	-	-	-
250	43,7	14,36	1,3	61,0	6,56**	2,2	113,0	1,00	1,0	111,0	5,29	1,0
500	59,3	12,10*	1,8	88,3	5,86**	3,3	115,6	11,59	1,0	108,0	6,24	1,0
1000	69,0	8,19**	2,1	199,0	18,36**	7,4	113,3	6,03	1,0	123,0	10,58	1,0
1500	98,0	2,00**	3,0				111,0	7,21	1,0	132,3	12,34	1,0
Contr. Posit.	178,0	14,14	5,43	1127,5	9,19	41,7	716,5	13,43	6,4	1209,5	119,50	11,1
Resultado rev/L	41 (33 – 50)			128 (111 – 144)			ND			ND		

Exp. 2	revertentes por placa											
	TA98						TA100					
Dose (ml equiv.)	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.							78,4	10,43	-	129,0	0,00	-
250							79,7	1,00	1,0	119,7	27,15	1,1
500	Não Realizado			Não Realizado			91,3	11,59	1,2	106,0	9,64	0,8
1000							87,3	6,03	1,1	106,3	3,51	0,8
1500							104,3	7,21	1,3	116,0	7,00	0,9
Contr. Posit.							286,5	9,93	3,7	884,0	64,26	6,9
Resultado rev/L	-			-			ND			ND		

DP- desvio padrão RM – razão de mutagenicidade ND – mutagenicidade não detectada ANOVA * p<0,05 ** p<0,01

Na segunda campanha realizada no local 1, a amostra de água bruta extraída pelo método que utiliza o Blue rayon apresentou atividade mutagênica

apenas para a linhagem TA98 na ausência e presença de mistura S9, com valores de 41 e 128 revertentes/L, respectivamente. Comparando-se com os resultados obtidos na primeira campanha a TA98 na ausência de mistura S9 apresentou menor atividade mutagênica, porém na presença de mistura S9 sua atividade foi maior sugerindo maior presença de compostos mutagênicos indiretos.

A atividade mutagênica observada para a TA100 na ausência de mistura S9, presente na amostra coletada durante a primeira campanha, não foi mais observada no extrato obtido da amostra coletada durante a segunda campanha, sugerindo modificações no tipo de contaminantes presentes no extrato, o que sugere que os efluentes lançados não apresentam mais o mesmo conjunto de compostos anteriormente detectados.

Estes resultados reforçam a sugestão de que pelo menos parte da atividade mutagênica detectada seja produzida por aminas policíclicas, que são detectadas principalmente pela linhagem TA98 em presença de ativação metabólica.

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos da amostra de água tratada submetida a extração com Blue rayon do ponto 1 para a segunda campanha.

Tabela 8- Resultados do teste de Ames para as linhagens TA98 e TA100 com e sem mistura S9 para a amostra de água tratada do ponto 1 na campanha de maio de 2001. Método de extração, Blue rayon.

Ponto1 Campanha2	revertentes por placa											
	TA98						TA100					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
Dose (ml equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	23,3	3,06	-	28,0	0,00	-	78,4	8,32	-	104,0	6,06	-
250	30,3	4,16	1,3	27,0	2,00	1,0	80,0	2,65	1,0	80,0	4,36	0,8
500	24,0	0,00	1,0	33,0	7,07	1,2	82,0	8,19	1,0	82,3	5,69	0,8
1000	-	-	-	43,0	8,49	1,5	79,0	10,15	1,0	78,3	9,07	0,7
1500	57,3	15,18*	2,4	84,0	5,66	3,0	79,0	7,07	1,0	85,7	5,13	0,8
Contr. Posit.	185,0	5,66	7,94	1083,5	26,16	38,7	237,0	15,56	3,0	213,0	11,31	2,0
Resultado rev/L	21 (13 – 29)			30 (21 – 38)			ND			ND		

DP- desvio padrão RM – razão de mutagenicidade ND – mutagenicidade não detectada ANOVA * p<0,05 ** p<0,01

A amostra de água tratada da campanha de maio de 2001 do ponto 1 apresentou atividade mutagênica apenas na linhagem TA98 na ausência e presença de mistura S9, apresentando valores de 21 e 30 revertentes/L respectivamente repetindo o resultado observado na primeira campanha.

Os resultados obtidos para a amostra coletada durante a primeira campanha quando comparados com a coletada durante a segunda o comportamento dos extratos foi o mesmo, porém os valores de atividade mutagênica obtidos na segunda foram maiores.

Nesta campanha não estavam presentes os compostos que apresentaram atividade mutagênica detectada pela TA100 no extrato obtido com o Blue rayon observados na campanha anterior, reforçando a sugestão de que compostos como aqueles presentes no extrato obtido da amostra de água bruta estão presentes também no extrato obtido da amostra de água tratada, por estarem passando pelo tratamento e não sendo gerados por ele.

Este comportamento muito semelhante em ambas as campanhas apoia a hipótese de que o tratamento não esteja sendo capaz de remover os compostos genotóxicos detectados na água bruta.

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos da amostra de água bruta submetida a extração com XAD-4 do ponto 1 para a segunda campanha.

Tabela 9- Resultados do teste de Ames para as linhagens TA98 e TA100 com e sem mistura S9 para a amostra de água bruta do ponto 1 na campanha de maio de 2001. Método de extração, XAD-4.

Ponto1 Campanha2	revertentes por placa											
	TA98											
	N						H+					
Dose (mg equiv.)	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	20,0	1,00	-	20,8	3,77	-	20,0	1,00	-	20,8	3,77	-
250	62,3	4,04**	3,1	73,7	10,02**	3,5	49,7	1,53**	2,5	56,7	3,06**	2,7
500	85,0	13,08**	4,2	148,7	16,29**	7,1	85,7	5,69**	4,3	73,0	10,44**	3,5
1000	94,0	7,81**	4,7	151,7	21,94**	7,3	100,7	22,19*	5,0	96,0	7,00**	4,6
1500	145,7	36,36*	7,3	281,3	65,13**	13,5	141,3	14,47**	7,0	108,0	1,73**	5,2
Contr. Posit.	161,3	31,39	8,1	795,7	134,8	38,2	161,3	31,39	8,1	795,7	134,8	38,2
Resultado rev/L	142 (114 – 165)			238 (200 – 276)			127 (108 – 147)			114 (99 – 128)		

Dose (mg equiv.)	TA100											
	N						H+					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	101,8	10,66	-	95,2	14,64	-	78,4	8,32	-	104,0	16,17	-
250	107,7	3,06	1,0	118,0	16,09	1,2	79,7	5,13	1,0	119,7	27,15	1,1
500	109,3	6,66	1,1	125,0	14,93	1,3	91,3	16,92	1,2	106,0	9,64	1,0
1000	112,7	26,63	1,1	127,0	32,08	1,3	87,3	13,65	1,1	106,3	3,51	1,0
1500	107,3	2,31	1,0	134,7	9,45*	1,4	104,3	5,51*	1,3	116,0	7,00	1,1
Contr. Posit.	486,0	89,09	4,7	1534,0	43,84	16,1	237,0	15,56	3,0	213,0	11,31	2,0
Resultado rev/L	ND			ND			ND			ND		

DP - desvio padrão

RM - razão de mutagenicidade

ANOVA * p<0,05

** p<0,01

Ambos os extratos, natural e ácido, obtidos pela extração com resina XAD-4 para água bruta, na segunda campanha, ponto 1, apresentaram atividade mutagênica apenas frente a linhagem TA98 na ausência e na presença de mistura S9. Quando comparado com os resultados obtidos durante

a primeira campanha os valores de atividade mutagênica obtidos durante segunda campanha foram maiores com exceção do resultado obtido para a TA98 na presença de mistura S9 no extrato ácido.

A atividade mutagênica observada para a TA100 na primeira campanha não foi detectada na segunda, fato também observado no extrato obtido com o Blue rayon, confirmando a mudança nas características dos compostos genotóxicos presentes neste local durante a realização deste trabalho. Isso pode ser devido a mudanças no sistema de tratamento dos efluentes lançados neste corpo d'água, mudanças nos processos industriais das indústrias locais ou troca de matérias primas como por exemplo substituição de corantes.

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos da amostra de água tratada submetida a extração com XAD-4 do ponto 1 para a segunda campanha.

Tabela 10- Resultados do teste de Ames para as linhagens TA98 e TA100 com e sem mistura S9 para a amostra de água tratada do ponto 1 na campanha de maio de 2001. Método de extração, XAD-4.

Ponto1 Campanha2	revertentes por placa											
	TA98											
	N						H+					
Dose (mg equiv.)	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	20,0	1,00	-	20,8	3,77	-	20,0	1,00	-	20,8	3,77	-
250	39,0	7,94*	1,9	26,7	4,51	1,3	59,0	10,44*	2,9	36,3	8,62	1,7
500	44,3	2,89**	2,2	36,3	3,79*	1,7	80,3	0,58**	4,0	48,3	6,11**	2,3
1000	64,0	4,36**	3,2	58,7	24,70	2,8	102,0	19,16**	5,1	76,7	9,50**	3,7
1500	93,3	15,50**	4,6	49,3	15,28	2,4	81,3	37,58	4,0	99,3	19,55**	4,8
Contr. Posit.	161,3	31,39	8,1	795,7	134,8	38,2	161,3	31,39	8,1	795,7	134,8	38,2
Resultado rev/L	47 (41 – 53)			24 (16 – 32)			94 (72 – 116)			54 (46 – 62)		
Dose (mg equiv.)	TA100											
	N						H+					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	101,8	10,66	-	95,2	14,64	-	101,8	10,66	-	95,2	14,64	-
250	125,3	10,50	1,2	120,3	15,04	1,2	154,3	11,68**	1,5	123,3	19,55	1,3
500	119,7	17,67	1,2	134,3	12,58*	1,4	177,3	19,01**	1,7	144,0	12,53*	1,5
1000	122,3	29,77	1,2	162,3	22,68*	1,7	226,3	35,10**	2,2	161,0	28,35*	1,7
1500	137,7	23,54	1,3	184,3	22,05**	1,9	280,7	13,32**	2,7	158,7	23,50*	1,7
Contr. Posit.	486,0	89,09	4,8	1534,0	43,84	16,1	486,0	89,09	4,8	1534,0	43,84	16,1
Resultado rev/L	ND			61 (47 – 76)			122 (106 – 137)			48 (32 – 63)		

DP - desvio padrão

RM - razão de mutagenicidade

ANOVA * p<0,05

** p<0,01

Nesta campanha para a amostra de água tratada extraída com XAD-4, foram obtidos resultados positivos para a linhagem TA98 em ambos os extratos tanto na ausência como na presença de mistura S9. Em ambos, após a adição da mistura S9 foi observada a diminuição da atividade mutagênica, comportamento característico de produtos gerados pelo processo de cloração,

pois estes compostos são mutágenos diretos sendo detectados na ausência de mistura S9 e tendo sua atividade diminuída ou perdida após biotransformação.

Para a linhagem TA100 o extrato natural apresentou apenas indícios de mutagenicidade na presença da mistura S9, enquanto o extrato ácido apresentou resultado positivo na mesma condição.

Na presença de mistura S9 detectou-se apenas indícios de mutagenicidade. Como os compostos genotóxicos gerados pela cloração e detectados pela linhagem TA98, os que são detectados pela TA100 também perdem sua atividade mutagênica quando biotransformados.

Neste extrato foram detectados não apenas os produtos gerados pela cloração mas também os compostos que passaram pelo tratamento, apresentando comportamento dos extratos diferente daqueles obtidos com o Blue rayon. Não é possível nos extratos obtidos com XAD-4 distinguir compostos gerados pela cloração de composto que já estavam presentes a água bruta e continuam presentes na água tratada.

Os resultados apresentados nas tabelas de 11 a 18 foram obtidos dos extratos das amostras do ponto 2, que não apresentava fontes aparentes de contaminação de composto policíclicos, em contraste ao ponto 1.

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos da amostra de água bruta submetida a extração com Blue rayon do ponto 2 para a primeira campanha.

Tabela 11- Resultados do teste de Ames para as linhagens TA98 e TA100 com e sem mistura S9 para a amostra de água bruta do ponto 2 na campanha de novembro de 2000. Método de extração, Blue rayon.

Ponto2 Campanha1	revertentes por placa											
	TA98						TA100					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
Dose (ml equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	24,7	2,52	-	28,0	3,94	-	120,7	13,67	-	109,2	9,00	-
250	25,0	2,00	1,0	30,0	0,00	1,1	140,3	16,86	1,1	121,5	12,02	1,1
500	26,5	4,95	1,0	36,0	6,00	1,3	98,7	6,81	0,8	88,7	7,23	0,8
1000	33,3	6,11	1,3	51,0	4,24**	1,8	81,3	3,79	0,7	90,3	9,29	0,8
1500	38,3	4,04*	1,6	42,3	14,47	1,5	94,3	21,57	0,8	89,0	7,55	0,8
Contr. Posit.	162,5	43,13	6,6	918,0	65,05	32,8	364,0	0,00	3,00	941,5	7,78	8,6
Resultado rev/L	10 (6 – 13)			12 (6 – 18)			ND			ND		

DP – desvio padrão RM – razão de mutagenicidade ND – mutagenicidade não detectada ANOVA * p<0,05 ** p<0,01

Nesta campanha a amostra de água bruta coletada no ponto 2 apresentou apenas indícios de mutagenicidade para a linhagem TA98 na ausência e na presença de mistura S9.

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos da amostra de água tratada submetida a extração com Blue rayon do ponto 2 para a primeira campanha.

Tabela 12- Resultados do teste de Ames para as linhagens TA98 e TA100 com e sem mistura S9 para a amostra de água tratada ponto 2 na campanha de novembro de 2000. Método de extração, Blue rayon.

Ponto2 Campanha1	revertentes por placa											
	TA98						TA100					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
Dose (ml equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	14,8	4,32	-	17,0	2,91	-	98,8	14,29	-	90,4	10,57	-
250	14,7	3,21	1,0	14,3	2,52	0,8	114,3	12,90	1,2	119,3	28,56	1,3
500	16,0	3,00	1,1	16,0	1,73	0,9	97,5	12,02	1,0	100,7	11,68	1,1
1000	16,7	3,21	1,1	19,0	2,64	1,1	99,7	2,08	1,0	104,7	14,50	1,2
1500	14,7	0,58	1,0	20,3	2,52	1,2	101,0	7,00	1,0	102,3	20,55	1,1
Contr. Posit.	117,0	9,84	7,9	651,0	16,97	38,3	400,5	73,83	4,0	1324,0	93,39	14,6
Resultado rev/L	ND			ND			ND			ND		

DP – desvio padrão RM – razão de mutagenicidade ND – mutagenicidade não detectada ANOVA * p<0,05 ** p<0,01

Para a amostra de água tratada do mesmo local e mesma campanha, todos os resultados foram negativos, confirmando os resultados de VARTIAINEN, et al., 1987, que demonstraram que o Blue rayon não era capaz de extrair de amostras de água tratada compostos formados durante o processo de cloração.

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos da amostra de água bruta submetida a extração com XAD-4 do ponto 2 para a primeira campanha.

Tabela 13- Resultados do teste de Ames para as linhagens TA98 e TA100 com e sem mistura S9 para a amostra de água bruta do ponto 2 na campanha de novembro de 2000. Método de extração, XAD-4.

Ponto2 Campanha1	revertentes por placa											
	TA98											
	N						H+					
Dose (mg equiv.)	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	17,6	4,32	-	17,0	2,91	-	21,2	3,35	-	20,0	3,46	-
250	25,7	4,93	1,4	18,0	6,08	1,1	28,7	3,79	1,3	30,0	7,55	1,5
500	17,3	2,08	1,0	23,3	4,04	1,4	36,3	2,08**	1,7	28,7	7,51	1,4
1000	19,3	4,16	1,1	20,3	6,03	1,2	47,0	4,58**	2,2	32,5	3,54	1,6
1500	21,3	2,08	1,2	27,0	2,83	1,6	50,7	12,90*	2,4	40,0	3,61**	2,0
Contr. Posit.	117,0	9,90	6,6	651,0	16,97	38,3	215,0	26,87	10,1	984,5	13,43	46,9
Resultado rev/L	ND			ND			22 (17 – 26)			13 (8 – 18)		

Dose (mg equiv.)	TA100											
	N						H+					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	98,8	14,28	-	90,4	10,57	-	107,0	19,34	-	108,0	11,07	-
250	110,0	9,54	1,1	114,3	15,95	1,3	119,3	8,08	1,1	117,0	6,93	1,1
500	89,3	14,57	0,9	99,7	4,04	1,1	108,0	1,41	1,0	118,0	19,08	1,1
1000	119,0	4,58	1,2	118,0	11,53	1,3	105,3	9,07	1,0	99,0	13,75	0,9
1500	110,7	7,37	1,1	121,0	12,12	1,3	106,0	14,00	1,0	114,7	15,28	1,0
Contr. Posit.	400,5	72,83	4,0	1324,0	93,34	14,6	107,5	26,16	1,0	1815,5	102,53	16,8
Resultado rev/L	ND			ND			ND			ND		

DP - desvio padrão

RM - razão de mutagenicidade

ANOVA* p<0,05

** p<0,01

Para a amostra de água bruta da primeira campanha realizada no ponto 2 o extrato ácido com a linhagem TA98 na ausência e na presença de mistura S9 apresentou indícios de mutagenicidade, concordando com os dados obtidos com o Blue rayon, sugerindo a presença de compostos policíclicos, adsorvidos

preferencialmente em pH ácido, resultado não esperado para este ponto de coleta.

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos da amostra de água tratada submetida a extração com XAD-4 do ponto 2 para a primeira campanha.

Tabela 14- Resultados do teste de Ames para as linhagens TA98 e TA100 com e sem mistura S9 para a amostra de água tratada do ponto 2 na campanha de novembro de 2000. Método de extração, XAD-4.

Ponto2 Campanha1	revertentes por placa											
	TA98											
	N						H+					
Dose (mg equiv.)	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	38,0	7,00	-	29,3	11,02	-	21,2	3,35	-	29,3	11,02	-
250	39,3	6,03	1,0	23,5	3,54	0,8	44,5	9,19	2,1	27,0	4,58	0,9
500	43,7	6,43	1,1	18,0	0,00	0,6	65,0	7,00	3,1	34,3	6,11	1,2
1000	42,7	2,08	1,1	19,7	4,04	0,6	97,0	1,41	4,6	36,7	1,15	1,2
1500	35,0	9,85	0,9	19,3	3,06	0,6	89,0	8,49	4,2	35,7	8,33	1,2
Contr. Posit.	153,0	27,70	4,0	494,5	81,52	16,9	984,5	13,41	46,4	494,5	81,52	16,9
Resultado rev/L	ND			ND			81 (70 – 92)			ND		

Dose (mg equiv.)	TA100											
	N						H+					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	119,7	12,66	1,0	98,2	9,52	1,0	119,7	12,66	1,0	98,2	9,52	1,0
250	93,0	5,29	0,7	80,0	2,65	0,8	156,3	22,03	1,3	107,7	20,50	1,1
500	83,3	9,71	0,7	83,3	2,52	0,8	241,3	17,01**	2,0	119,3	15,89	1,2
1000	81,3	4,04	0,7	87,7	7,37	0,9	258,0	13,00**	2,1	120,3	7,77	1,2
1500	95,7	10,02	0,8	102,0	4,58	1,0	281,3	62,12*	2,3	131,7	12,01*	1,3
Contr. Posit.	448,5	112,18	3,7	975,7	162,58	9,9	448,5	112,18	3,7	975,7	162,58	9,9
Resultado rev/L	ND			ND			150 (115 – 192)			ND		

DP - desvio padrão

RM - razão de mutagenidade

ANOVA* p<0,05

** p<0,01

Na amostra de água tratada apenas o extrato ácido apresentou atividade mutagênica tanto para a linhagem TA98, com menor intensidade, como para a linhagem TA100 na ausência de mistura S9.

SHENCK, et al., 1998, afirmaram no seu trabalho que os compostos genotóxicos gerados durante o processo de cloração são extraídos das amostras de água tratada preferencialmente em pH ácido (≤ 2) e principalmente pela linhagem TA100 na ausência de mistura S9.

STOPPE, et al., 1998, em seu estudo realizado com amostras da região metropolitana de São Paulo, demonstraram que em extratos obtidos de amostra de água tratada provenientes de locais em que os extratos obtidos da água bruta não apresentavam atividade mutagênica, as amostras de água tratada podem apresentar resultados positivos para o teste de Ames com a linhagem TA100 com maior intensidade e TA98 ambas na ausência de mistura S9.

Estes resultados concordam com os dados de SHENCK, et al., 1998 e STOPPE, et al., 1998, e sugerem a presença de compostos genotóxicos gerados pela reação entre ácidos húmicos e cloro livre durante o tratamento.

A atividade mutagênica detectada nos extratos obtidos da amostra de água bruta extraídos tanto com Blue rayon como com XAD-4 aparentemente foi removida com eficiência pelo tratamento, pois na água tratada o Blue rayon não foi capaz de adsorver compostos com atividade mutagênica e a XAD-4 adsorveu apenas compostos com características de produtos genotóxicos gerados durante a cloração.

Com estes dados podemos confirmar que o Blue rayon não foi capaz de adsorver produtos de cloração genotóxicos, podendo ser utilizado para distinguir os produtos genotóxicos que passaram pelo tratamento dos gerados por ele.

A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos da amostra de água bruta submetida a extração com Blue rayon do ponto 2 para a segunda campanha.

Tabela 15- Resultados do teste de Ames para as linhagens TA98 e TA100 com e sem mistura S9 para a amostra de água bruta do ponto 2 na campanha de abril de 2001. Método de extração, Blue rayon.

Ponto2 Campanha2	revertentes por placa											
	TA98						TA100					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
Dose (ml equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	22,7	1,53	-	26,6	6,02	-	116,0	6,04	-	118,6	7,70	-
250	22,3	4,62	1,0	23,7	6,43	0,8	128,0	6,24	1,1	123,3	14,43	1,0
500	24,7	2,08	1,0	26,7	1,15	1,0	127,3	16,92	1,0	129,7	9,07	1,1
1000	24,3	2,08	1,0	28,3	1,15	1,0	111,0	0,00	0,9	125,0	12,53	1,0
1500	28,0	4,00	1,2	29,0	4,00	1,0	110,7	11,59	0,9	121,7	10,41	1,0
Contr. Posit.	140,0	0,00	6,2	743,0	2,12	27,9	286,5	9,19	2,5	884,0	62,23	7,4
Resultado rev/L	ND			ND			ND			ND		

DP – desvio padrão RM – razão de mutagenicidade ND – mutagenicidade não detectada ANOVA * p<0,05 ** p<0,01

A amostra de água bruta do ponto 2 na segunda campanha apresentou todos os resultados negativos para a extração com Blue rayon, como esperado para este ponto, por não apresentar fontes aparentes de compostos policíclicos.

Mesmo este ponto tendo apresentado indícios de mutagenicidade para a linhagem TA98 na ausência e na presença de mistura S9 no extrato obtido da amostra de água bruta coletada na primeira campanha, os resultados obtido na segunda campanha demonstram que este local não apresentou como esperado, contaminação por compostos genotóxicos policíclicos.

A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos da amostra de água tratada submetida a extração com Blue rayon do ponto 2 para a segunda campanha.

Tabela 16- Resultados do teste de Ames para as linhagens TA98 e TA100 com e sem mistura S9 para a amostra de água tratada do ponto 2 na campanha de abril de 2001. Método de extração, Blue rayon.

Ponto2 Campanha2	revertentes por placa											
	TA98						TA100					
Dose (ml equiv.)	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	27,4	6,11	-	24,4	3,36	-	93,4	4,56	-	87,8	9,04	-
250	27,0	5,57	0,9	23,0	0,00	0,9	99,3	5,86	1,1	88,7	15,53	1,0
500	35,0	6,24	1,2	34,0	8,89	1,4	101,3	6,81	1,1	86,3	17,24	0,9
1000	34,5	10,61	1,2	37,3	6,66	1,5	95,7	11,02	1,0	108,3	7,02	1,2
1500	32,3	9,45	1,1	30,5	6,36	1,2	104,0	10,15	1,1	118,3	12,06*	1,3
Contr. Posit.	601,5	12,02	21,9	1165,5	9,19	47,8	287,0	2,83	3,1	934,0	90,51	10,6
Resultado rev/L	ND			ND			ND			ND		

DP – desvio padrão RM – razão de mutagenicidade ND – mutagenicidade não detectada ANOVA * p<0,05 ** p<0,01

A amostra de água tratada do ponto 2, na segunda campanha, apresentou todos os resultados negativos para a extração com Blue rayon, concordando com os resultados da primeira campanha, e com o trabalho de VARTIAINEN, et al., 1987, que demonstrou que o Blue rayon não é capaz de adsorver os compostos genotóxicos produzidos durante o processo de cloração.

A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos da amostra de água bruta submetida a extração com XAD-4 do ponto 2 para a segunda campanha.

Tabela 17- Resultados do teste de Ames para as linhagens TA98 e TA100 com e sem mistura S9 para a amostra de água bruta do ponto 2 na campanha de abril de 2001, Método de extração, XAD-4.

Ponto 2 Campanha2	revertentes por placa											
	TA98											
	NB						H+					
Dose (mg equiv.)	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	20,0	1,00	-	20,8	3,77	-	22,7	1,53	-	26,6	6,02	-
250	17,0	1,00	0,8	20,7	1,53	1,0	20,0	0,00	0,8	26,7	4,62	1,0
500	19,0	3,00	0,9	27,0	4,24	1,3	30,0	6,93	1,3	31,7	5,03	1,1
1000	18,5	0,71	0,9	19,0	1,41	0,9	25,0	2,65	1,1	25,3	5,51	0,9
1500	25,3	6,43	1,2	24,0	1,41	1,1	25,0	0,00	1,1	35,7	4,04	1,3
Contr. Posit.	153,0	27,70	7,6	494,5	81,52	23,8	140,0	0,00	6,2	743,5	2,12	27,9
Resultado	ND			ND			ND			ND		

Dose (mg equiv.)	TA100											
	NB						H+					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	116,0	6,04	-	118,6	7,70	-	116,0	6,04	-	118,6	7,70	-
250	141,7	13,58	1,2	133,3	4,16	1,1	145,5	4,95**	1,2	131,3	5,86	1,1
500	126,0	2,38	1,0	130,7	9,71	1,1	129,5	19,09	1,1	118,0	0,00	1,1
1000	116,0	24,27	1,0	106,3	14,57	0,8	126,0	14,14	1,0	132,0	17,69	1,1
1500	119,7	6,03	1,0	115,7	9,07	0,9	134,0	12,17	1,1	121,3	19,30	1,0
Contr. Posit.	286,5	9,19	2,5	884,0	62,23	7,4	286,5	9,19	2,5	884,0	62,23	7,4
Resultado	ND			ND			ND			ND		

DP - desvio padrão

RM - razão de mutagenicidade

ANOVA * p<0,05

** p<0,01

Esta amostra de água bruta apresentou todos os resultados negativos, não repetindo os indícios de mutagenicidade detectados no extrato ácido com a linhagem TA98 na ausência e na presença de mistura S9, observados na campanha anterior.

A Tabela 18 apresenta os resultados obtidos da amostra de água tratada submetida a extração com XAD-4 do ponto 2 para a segunda campanha.

Tabela 18- Resultados do teste de Ames para as linhagens TA98 e TA100 com e sem mistura S9 para a amostra de água tratada do ponto 2 na campanha de abril de 2001. Método de extração, XAD-4.

Ponto2 Campanha2	revertentes por placa											
	TA98											
	NB						H+					
Dose (mg equiv.)	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	23,3	3,06	-	28,5	0,00	-	23,3	3,06	-	28,0	0,00	-
250	32,3	12,6	1,4	-	-	-	38,7	8,14	1,7	29,0	4,00	1,0
500	28,0	6,08	1,2	29,3	2,52	1,0	48,7	8,33	2,1	28,3	4,51	1,0
1000	24,3	3,06	1,0	28,0	4,58	1,0	49,3	9,45	2,1	31,0	5,00	1,1
1500	23,3	1,53	1,0	28,0	3,46	1,0	52,3	2,52	2,2	28,0	4,24	1,0
Contr. Posit.	185,0	5,66	7,9	566,5	62,93	19,9	140,0	0,00	6,2	795,7	134,08	28,4
Resultado rev/L	ND			ND			29 (20 – 38)			ND		
Dose (mg equiv.)	TA100											
	NB						H+					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	93,4	4,56	-	87,8	9,04	-	93,4	4,56	-	118,6	7,70	-
250	103,7	12,90	1,1	101,0	18,68	1,1	182,0	39,15*	1,9	146,3	14,84	1,2
500	95,0	12,00	1,0	97,0	3,00	1,1	177,7	37,74*	1,9	139,0	16,09	1,2
1000	93,3	9,02	1,0	94,0	4,00	1,1	171,5	0,71**	1,8	154,0	5,20**	1,3
1500	95,3	11,93	1,0	90,3	15,82	1,1	342,0	168,29	3,6	161,7	21,55	1,3
Contr. Posit.	287,0	2,83	3,1	934,0	90,51	10,6	287,0	2,83	3,1	884,0	62,23	7,4
Resultado rev/L	ND			ND			125 (85 – 165)			ND		

DP - desvio padrão

RM - razão de mutagenicidade ANOVA * p<0,05

** p<0,01

O extrato ácido desta amostra apresentou resultados positivos para as linhagens TA98 e TA100 na ausência de mistura S9, sendo que os maiores valores foram obtidos com a TA100, concordando com os dados obtidos

durante a primeira campanha e confirmando que o ponto 2 apresentava pouca ou nenhuma mutagenicidade na água bruta, que foi removida com eficiência pelo tratamento.

Com estes dados, e como observado por VARTIAINEN, et al., 1987, podemos sugerir que o Blue rayon não é capaz de adsorver os produtos genotóxicos gerados pela reação entre o cloro livre e ácidos húmicos detectados pela resina XAD-4 neste estudo, tornando este método útil para distinguir a atividade genotóxica destes produtos da atividade de compostos presentes na água bruta que passaram pelo tratamento e apresentam sua atividade nas águas tratadas. Mais estudos deveriam ser conduzidos para avaliar com mais precisão a vida útil do Blue rayon quando utilizado para extração de amostras cloradas, não apenas de águas tratadas para consumo como também efluentes tratados. Sugerimos também fazer testes com extratos de amostras que sofram a inativação do cloro por quelantes.

Os resultados obtidos para as amostras de água tratada extraídas com XAD-4 do ponto 2 concordam com aqueles obtidos por STOPPE, et al., 1998, para a região metropolitana de São Paulo e podem ser considerados baixos quando comparados com águas tratadas de outros locais do mundo (VARTIAINEN, et al., 1987; MEIER, 1990; SCHENK, et al., 1998).

5.4. Resumo dos dados obtidos para as amostras analisadas

A Tabela 19 apresenta o resumo de todos os resultados obtidos durante este trabalho para as amostras de águas brutas e tratadas.

Tabela 19- Resumo dos dados obtidos.

Descrição	linhagem	revertentes por litro							
		água bruta				água tratada			
		XAD			Blue rayon	XAD			Blue rayon
		N	H+	TOTAL		N	H+	TOTAL	
Ponto 1 Campanha 1	TA98-S9	16	118	134	64	100	117	217	15
	TA98+S9	74	151	225	40	26	58	84	12
	TA100-S9	ND	ND	ND	35	ND	130	130	ND
	TA100+S9	87	89	176	ND	ND	ND	ND	ND
Ponto 1 Campanha 2	TA98-S9	142	127	269	41	47	94	141	21
	TA98+S9	238	114	352	128	24	54	78	30
	TA100-S9	ND	ND	ND	ND	ND	122	122	ND
	TA100+S9	ND	ND	ND	ND	61	48	109	ND
Ponto 2 campanha 1	TA98-S9	ND	22	22	10	ND	81	81	ND
	TA98+S9	ND	13	13	12	ND	ND	ND	ND
	TA100-S9	ND	ND	ND	ND	ND	150	150	ND
	TA100+S9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ponto 2 campanha 2	TA98-S9	ND	ND	ND	ND	ND	29	29	ND
	TA98+S9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	TA100-S9	ND	ND	ND	ND	ND	125	125	ND
	TA100+S9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Analisando este conjunto de dados apresentados na Tabela 19 e na Figura 10, pode ser observado que os extratos obtidos com Blue rayon apresentaram resultados mais baixos ou negativos quando comparados com os resultados obtidos com a XAD-4, o que pode ser explicado devido a sua seletividade por compostos policíclicos.

A utilização da combinação do teste de Ames em microssuspensão - teste de KADO (KADO, et al., 1983.) e linhagens de *Salmonella typhimurium*

YGs mais sensíveis as classes de compostos para os quais o Blue rayon apresenta maior seletividade, podem ser confirmadas as sugestões obtidas com os dados apresentados neste trabalho.

A figura 10 ilustra o resumo dos resultados obtidos neste trabalho.

Fig.10 - Representação gráfica de todos os resultados obtidos durante este trabalho, expressos em revertentes/litro.

Analisando a Figura 10 podemos observar que quando foi detectada atividade mutagênica nas amostras de água bruta e tratada, os extratos obtidos com XAD-4 apresentaram maior potência que os extratos obtidos com Blue rayon, sugerindo que a contaminação genotóxica é composta não apenas por compostos policíclicos mas também por outros compostos que são responsáveis pela maior parte da atividade mutagênica total detectadas nos extratos, e não foram detectados pelo Blue rayon.

Foi confirmado também que o Blue rayon não se mostrou capaz de adsorver os compostos genotóxicos formados durante o procedimento de cloração das estações de tratamento de água, como havia sido sugerido por VARTIAINEN, et al., 1987.

Os dados da segunda campanha reforçam as sugestões da primeira campanha confirmando que o Blue rayon é capaz de adsorver compostos na água tratada que já estavam presentes na água bruta mas não compostos formados pela reação entre o cloro livre e ácidos húmicos.

6. Conclusões

- A eficiência do Blue rayon na recuperação da atividade mutagênica induzida pelo 2AA foi similar aquela apresentada pelo método que utiliza XAD-4.
- Os dados da análise de fortificação com 2AA, mostram que o Blue rayon pode ser reutilizado e que o protocolo de lavagem padronizado foi eficiente para o objetivo proposto pelo trabalho.
- O ponto 1 apresentou contaminação com compostos policíclicos genotóxicos que não estão sendo totalmente removidos pelo tratamento d'água.
- O Blue rayon não foi capaz de detectar a presença dos composto formados pela reação entre o cloro livre e ácidos húmicos, detectados pela XAD-4 na água tratada, sendo útil para diferenciar a atividade mutagênica dos compostos formados durante o processo de cloração daqueles que passaram pelo tratamento.

7. Recomendações

- Ações de controle devem ser tomadas para eliminar a contaminação por compostos genotóxicos presentes no ponto 1 para se evitar abastecer a população com água contendo compostos químicos de risco desconhecido.
- Através de mais estudos verificar o número mais adequado de reutilizações do Blue rayon quando usado em amostras de água tratada.
- Realizar experimentos que utilizam linhagens mais sensíveis a compostos policíclicos das classes das aminas aromáticas e nitro-HPAs associados ao teste de Ames em microssuspensão em extratos obtidos pelo Blue rayon para aumentar a sensibilidade do método proposto.
- Realizar análises químicas para identificar e quantificar os compostos genotóxicos detectados nas amostras testadas para reforçar as conclusões acima e dar suporte à ações de controle e prevenção.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMES, B.N.- The detection of mutagens with enteric bacteria. In: HOLLANDER, A., ed. **Chemical mutagens: principles and methods for their detection**, New York: Plenum, 1971. V.1, 267-287.

AMES, B.N., McCANN, J., YAMASAKI, E.- Methods for detection carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.31, p. 347-364, 1975.

BACKLUND, P., WONDERGEM, E., VOOGD, K., JONG, A.D. Mutagenic activity and presence of the strong mutagen 3-chloro-4(dichloromethyl)-5-hydroxy-2-(5H)-furanone(MX) in chlorinated raw and drinking water in the Netherlands. **Sci. Total Environ.**, Shannon, v.84, p.273-282, 1989.

BAUN, A., NYHOLM, N. Monitoring pesticides in surface water using bioassays on XAD-2 preconcentrated sample. **Water Sci. Technol.**, London, v.33, p. 339-347, 1996.

BELAND, F.A., KADLUBAR, F.F. Metabolic activation and DNA adducts of aromatic amines and nitroaromatic hydrocarbons. In: **Chemical carcinogenesis and mutagenesis I.**, COOPER & GROVER, New York, Springer-Verlag., 1994.

BERNSTEIN, L., KALDOR, J., McCANN, J., PIKE, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from *Salmonella* test. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.97, p.267-281, 1982.

BICKHAM, J.W., SANDHU, S., HEBERT, P.D.N., CHIKHI, L., ATHWAL, R.
Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural
populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutat.
Res.**, Amsterdam, v.9463, p.33-51, 2000.

BRASIL, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 20 de 18 de
junho de 1986, Classifica as águas do Território Nacional, Diário Oficial da
União, Brasília, 30 de junho de 1986.

BRASIL, Portaria nº 1469, de 29 de dezembro de 2000, Estabelece os
procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da
qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e
dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 19 de fevereiro
de 2001, Seção 1, p.84-87.

BRASIL, Portaria nº 36 de 19 de janeiro de 1990, Aprova normas e padrão
de potabilidade da água destinada ao consumo humano. **Diário Oficial**,
Brasília, 23 de janeiro de 1990, p. 1651-1654.

BRUSICK, D.J., GOPALAN, H.N.B., HESELTINE, E., HUISMANS, J.W.,
LOHMAN, P.H.M. (EDS.) **Assessing the risk of genetic damage**.
HODDER & STOUGHTON, Nairobi, 1992.

CANADA. **Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of
Aquatic Life**, Canadian Council of Ministers of the Environment, 2001.

CARRARO, E., BUGLIOSI, E.H., MEUCCI, L., BAIOCCHI, C., GILLI, G.
Biological drinking water treatment processes, with special reference to
mutagenicity. **Water Res.**, Oxford, v.34(11), p.3042-3054, 2000.

CETESB, São Paulo. **Mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium*- Teste de Ames**. Norma Técnica CETESB L5.620, p.38, 1993.

CETESB, São Paulo. **Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo 2000/CETESB**. Série Relatórios CETESB, v 1, p.2, 2001.

COELHO, M.C.L.S. **Mutagenicidade de quatro efluentes líquidos industriais lançados no Rio Paraíba do Sul, avaliada através do teste de Ames**. São Paulo, 1995. 81p. (Dissertação de Mestrado— Instituto de Biociências – USP).

CLAXTON, L.D., ALLEN, J., AULETA, A., MORTELMANS, K., NESTMANN, E., ZEIGER, E. Guide for the *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome test for bacterial mutagenicity. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.189, p.83-91, 1987.

DRESSLER, M. Extraction of trace amounts of organic compounds from water with porous organic polymers. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.165, p.167-206, 1979.

DUTKA, B.J., JOVA, A., BRECHIN, J. Evaluation of four concentration/extraction procedures on water and effluents collected for use with *Salmonella typhimurium* screening procedures for mutagens. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v.27, p.154-169, 1981.

DUTKA, B.J., LIU, D.L., JURKOVIC, A., McINNIS, R. A comparison of four simple water extraction-concentration procedures to be used with the battery of bioassay test approach. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, New York, v.8, p.397-407, 1993.

FEDERAL REGISTER. **Guidelines Establishing test procedures for the analysis of pollutants.** Washington, v.44 (223), 1979.

FEDERAL REGISTER. **Water quality standards; Establishment of numeric criteria for priority toxic pollutants for the State of California; Rules.** California, v.65 (97), 2000.

FERNÁNDEZ, A., TEJEDOR, C., CABRERA, F., CHORDI, A. Assessment of toxicity of river water and effluents by the bioluminescence assay using *Photobacterium phosphoreum*. **Water Res.**, Oxford, v.29, n.5, p.1281-1286, 1995.

FILIPIC, M., TOMAN, M. J. Ecotoxicological studies using modified Ames bioassay. **Water Sci. Technol.**, London, v.34, p.1-7, 1996.

FUKAZAWA, H., MATSUSHITA, H., TERAQ, Y. Identification of co-mutagenic chlorinated harmans in final effluent from a sewage treatment plant. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.491, p.65-70, 2001.

GILLER, S., LE CURIEUX, F., ERB, F., MARZIN, D. Comparative genotoxicity of halogenated acetic acids found in drinking water. **Mutagenesis**, Oxford, v.12(5), p.321-328, 1997.

GUZZELLA, L., SORA, S. Mutagenic activity of lake water sample used as drinking water resources in norten Italy. **Water Res.**, Oxford, v.32, p.1733-1742, 1998.

HALL, M., GROVER, P.L. Metabolic ativation and DNA adducts of aromatic amines and nitroaromatic hidrocarbons. In: COOPER & GROVER **Chemical carcinogenesis and mutagenesis**. New York, Springer-Verlay, 1994.

HAYATSU, H. Cellulose bearing covalently linked copper phthalocyanine trisulphonate as an adsorbent selective for polycyclic compounds and its use in studies of environmental mutagens and carcinogens. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.597, p.37-56, 1992.

HAYATSU, H., OHARA, Y., HAYATSU, T., TOGAWA, K. Mutagenicity of chalks A case in which the test result led to the improvement of the quality of commercial goods. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.124, p.1-7, 1983a.

HAYATSU, H., OKA, T., WAKATA, A., OHARA, Y., HAYATSU, T., KOBAYASHI, H., ARIMOTO, S. Adsorption of mutagens to cotton bearing covalently bound trisulfo-copper-phthalocyanine. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.119, p.233-238, 1983b.

HAYATSU, H., TOSHIKO, H., ARIMOTO, S., SAKAMOTO, H. A short-column technique for concentrating mutagens/carcinogens having polycyclic structures. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.235, p.185-190, 1996.

JUNK, G.A., RICHARD, J.J., GRIESER, M.D., WITIAK, D., WITIAK, J.L., ARGUELLO, M.D., VICK, R., SVEC, H.J., FRITZ, J.S., CALDER, G.V. Use of macroreticular resin in the analysis of water for trace organic contaminants. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.99, p.745-762, 1974.

KADO, N.Y., LANGLEY, D., EISENSTADT, E. A simple modification of the *Salmonella* liquid incubation assay. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.121, p.25-32, 1983.

KATAOKA, H. Methods for the determination of mutagenic heterocyclic amines and their application in environmental analysis. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.774, p.121-142, 1997.

- KATAOKA, H., HAYATSU, T., HIETSCH, G., STEINKELLNER, H., NISHIOKA, S., NARIMATSU, S., KNASMÜLLER, S., HAYATSU, H. Identification of mutagenic heterocyclic amines (IQ, Trp-P-1 and AαC) in the water of Danube river. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.466, p.27-35, 2000.
- KIMIKO, H., KITAMURA, E., et al. Simutaneous determination of trace pesticides in urban precipitation. **Atmos. Environ.**, Oxford, v.29, p.247-253, 1995.
- KIRA, S., ITO, T., et al. Detection of waterborne mategens and characterization of chemicals in selected galveston sites after an oil spill. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v.53, p.285-291, 1994.
- KIRA, S., NOGAMI, Y., ITO, T., HAYATSU, H. Mensurament of a time-weighted average concentration of polycycli aromatic hidrocarbons in seawater: an improved procedure of Blue Rayon hanging technique for monitoring Benzo(a)pyrene. **Mar. Environ. Res.**, Oxford, v.46, p.267-271, 1998.
- KIRA, S., TAKETA, K., NOGAMI, Y., HAYATSU, H. A simple tecnique for monitoring mutagenicity and Benzo(a)pireno content in mussels and their ambient water. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, New York, v.10, p.167-172, 1995.
- KUSAMRAN, W.R., WAKABAYASHI, K., OGURI, A., TEPSUWAN, A., NAGAO, M., SUGIMURA, T. Mutagenicities of Bangkok and Tokyo river waters. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.325, p.99-104, 1994.
- MARON, D.N., AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.113, p.173-215, 1983.

- McCANN J., AMES B.N. The *Salmonella*/microsome mutagenicity test: predictive value for animal carcinogenicity. In: **Origins of human cancer**, HIATT, H.H., WATSON, J.D., WINSTEIN, J.A., New York, 1977, p.1431-1450.
- McGEORGE, L.S., LOUIS, J.B., ALTRERHOLT, T.B., McGARRITY, G.J. Mutagenicity analysis of industrial effluents: Results and consideration for integration into water pollution control programs. In: **Short term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures.**, WATERS, et al., Plenum, USA, v.4, p.247-267, 1985.
- MEIER, J.R. Mutagens in chlorinated water. **Mutat. Environ.**, v.340, p.11-19, 1990.
- MIETTINEN, I.T., MARTIKAINEN, P.J., VARTIAINEN, T. Mutagenicity and amount of chloroform after chlorination of bank filtered lake water. **Sci. Total Environ.**, Shannon, v.215, p.9-17, 1998.
- MORTELMANS, K., ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.455, p.29-60, 2000.
- ESTADOS UNIDOS. National Oceanic and Atmospheric Administration. **NOAA and University of Michigan scientists discover tumors in freshwater zooplankton.** Disponível em <<http://www.publicaffairs.noaa.gov/releases99/may99/noaa99r511.html>>. Acesso em 20 ago. 2001.
- NOGAMI, Y., IMAEDA, R., ITO, T., KIRA, S. Benzo(a)pireno adsorbed to suspended solids in fresh water. **Environ. Toxicol.**, v.15, p. 500-503, 1999.

- NUKAYA, H., SHIOZAWA, T., TADA, A., TERAQ, Y., OHE, T., WATANABE, T., ASANOMA, M., SAWANISHI, H., KATSUHARA, T., SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K. Identification of 2-[2-(acetilamino)-4-amino-5-metoxifenil]-5-amino-7-bromo-4-cloro-2*H*-benzotriazol(PBTA-4) as a potent mutagen in river water in Kyoto and Aichi prefectures, Japan. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.492, p.73-80, 2001.
- NUKAYA, H., YAMASHITA, J., TSUJI, K., TERAQ, Y., OHE, T., SAWANISHI, H., KATSUHARA, T., KIYOKAWA, K., TEZUCA, M., OGURI, A., SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K. . Isolation and chemical-structural determination of a novel aromatic amine mutagen in water for the Nishitakase river in Kyoto. **Chem. Res. Toxicol.**, Columbus, v.10(10), p.1061-1066, 1997.
- OGURI, A., SHIOZAWA, T., TERAQ, Y., NUKAYA, H., YAMASHITA, J., OHE, T., SAWANISHI, H., KATSUHARA, T., SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K. Identification of a 2- Phenylbenzotriazole (PBTA)-type mutagen, PTA-2, in water from the Nishitakase river in Kioto. **Chem. Res. Toxicol.**, Columbus, v.11, p.1195-1200, 1998.
- OHE, T., Evaluation of SOS-inducing activity with an O-acetiltransferase-overexpressing strain *Salmonella typhimurium* NM2009 for municipal river water and the identification of 1-nitropirene. **Water Sci. Technol.**, London, v.33, n.6, p.313-320, 1996.
- OHE, T., Quantification of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines, MeIQX, Trp-P-1, Trp-P-2 and PhIP, contributing highly to genotoxicity of river water. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.393, p.73-79, 1997.

- OHE, T., SHAUGHNESSY, D.T., LANDI, S., TERAQ, Y., SAWANISHI, H., NUKAYA, H., WAKABAYASHI, K., DEMARINI, D.M., Mutation spectra in *Salmonella* TA98, TA100, e TA104 of phenylbenzotriazole mutagens (PBTA-1 and PBTA-2) detected in the Nishitakase river in Kyoto, Japan. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.429, p.189-198, 1999.
- OHE, T., TAKEUCHI, N., WATANABE, T., TADA, A., NUKAIA, H., TERAQ, Y., SAWANISHI, H., HIRAYAMA, T., SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K. Quantification of two aromatic amine mutagens, PBTA-1 and PBTA-2, in the Yodo river system. **Environ. Health Perspect.**, Research Triangle Park, v.107(9), p.701-704, 1999.
- ONO, Y., SOMIYA, I., ODA, Y. Identification of a carcinogenic heterocyclic amine in river water. **Water Res.**, Oxford, v.34(3), p.890-894, 2000.
- OTSU, R., HORIKAWA, K., MIN, B.Y. Mutagenicity of river water in Korea. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v.60, p.615-619, 1998.
- PARK, J. H., LEE, B.J., LEE, S.K., KIM, K., LEE, K.H., CHE, J.H., KANG, K.S., LEE, Y.S. Genotoxicity of drinking water from three Korean cities. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.466, p.173-178, 2000.
- PELLIZZARI, E.D., SHELDON, L.S., BURSEY, J.T., MICHAEL, L.C., ZWEIDINGER, R.A. Master analytical scheme for organic compounds in water. **EPA.**, Athens, v.9, p.154-169, 1984.
- SAKAMOTO, H., HAYATSU, H. A simple method for monitoring mutagenicity of river water. Mutagens in Yodo river system, Kyoto- Osaka. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v.44, p.521- 528, 1990.

- SAKAMOTO, H., OHE, T., HAYATSU, T., HAYATSU, H. Evaluation of Blue-chittin column , Blue-rayon hanging and XAD-resin column techniches for concentrating mutagens from two Japanese rivers. **Mutat. Res.**, Amsterdam,v.371, p.79-85 1996.
- SÃO PAULO (ESTADO), Decreto nº 8468 de 8 de setembro de 1976, Dispõe sobre a prevenção e o controle do meio ambiente. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo, 8 de setembro de 1976.
- SÃO PAULO (ESTADO), Decreto nº 12.486 de 20 de outubro de 1978, Dispõe sobre águas de consumo alimentar. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo, 20 de outubro de 1978.
- SÃO PAULO (ESTADO), Resolução SS - 293 de 25 de outubro de 1996, Estabelece os procedimentos do Programa de Vigilância da Qualidade da Água para consumo Humano no Estado de São Paulo e dá providências correlatas. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo, 25 de outubro de 1996.
- SCHENCK, K.M., WYNER, L.J., LYKINS Jr, B.W., CLARK, R.M. Application of a finnish mutagenicity model to drinking water in the U.S. **Chemosphere**, Oxford, v.37(3), p.451-464, 1998.
- STOPPE, N.C.; ROUBICEK, D.A.; COIMBRÃO, C.A.; SATO, M.I.Z. & VALENT, G.U.- Mutagenicity of chlorinated drinking water treatment plants (WTP) of São Paulo metropolitan area. V Congresso Latino Americano de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental em Curitiba, PR, Brasil. **Genetics Molec. Biol.**, v.21(3), p.125, 1998.

- THEODORAKIS, C.W., SWARTZ, C.D., ROGERS, W.J., BICKHAM, J.W., DONNELLY, K.C., ADAMS, S.M. Relationship between genotoxicity, mutagenicity, and fish community structure in a contaminated stream. **J. Aquat. Ecosyst. Stress and Recovery**, Dordrecht, v.7, p.131-143, 2000.
- TOLOSA, I., READMAM, J.W., MEE, L. D. Comparison of the performance of solid-phase extraction techniques in recovering organophosphorus and organochlorine compounds from water. **J. Chromat.**, Amsterdam, v.725, p.93-106, 1996.
- UMBUZEIRO, G.A., ROUBICEK, D.A., SATO, M.I.Z., SANCHEZ, P.S. The *Salmonella* mutagenicity assay in a surface water quality monitoring program based on a 20-year survey. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.491, p.119-126, 2001.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, U.S.EPA. Office of Water, **Drinking Water Standards and Health Advisories**, EPA 822-B-00-001, 2000.
- VALENT, G.U. **Avaliação da atividade mutagênica de extratos orgânicos de corpos d'água do Estado de São Paulo através do teste de Ames**. Campinas, 1990. 134p. (Tese de Doutorado – Instituto de Biologia – UNICAMP).
- VALENT, G.U., ROUBICEK, D.A., HAEBISCH, E.M.A.B. Mutagenic and antimutagenic evaluation of the juice of the leaves of *Bryophyllum calycinum* (Kalanchoe pinnata), a plant with antihistamine activity. **Environ. Mol. Mutagen.**, New York, v.33, p.325-327, 1999.

- VAN LEEUWEN, F.X.R.- Safe drinking water: the toxicologist's approach. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.38, p.51-58, 2000.
- VARGAS, V.M.F., GUIDOBONO, R.R., JORDÃO, C., HENRIQUES, J.A.P.
Use of two short-term test to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration/extraction procedures. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.343, p.31-52, 1995.
- VARTIAINEN, T., LIIMATAINEN, A., JÄÄSKELAINEN, S., KAURANEN, P.
Comparison of solvent extractions and resin adsorptions for isolation of mutagenic compounds from chlorinated drinking water with high humus Content. **Water Res.**, Oxford, v.21(7), p.773-779, 1987.
- WATANABE, T., NUKAYA, H., TERAOKA, Y., TAKAHASHI, Y., TADA, A., TAKAMURA, T., SAWANISHI, H., OHE, T., HIRAYAMA, T., SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K. Synthesis of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens, PBTA-5 and PBTA-6, and their detection in river water from Japan. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 498 , p.107-115, 2001.
- WIGILIUS, B., BORÉN, H., CARLBERG, G.E., GRIMVALL, A., LUNDGREN, B.V., SÄVENHED, R. Systematic approach to adsorption on XAD-2 resin for the concentration and analysis of trace organics in water below the $\mu\text{g/L}$ level. **J. Chromat.**, Amsterdam, v.391, p.169-182, 1987.