B i o l o g i a
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de pós-graduação em Toxicologia e
Análises Toxicológicas

**A técnica de Blue rayon *in situ* associada ao teste Salmonella/microsossoma
como estratégia para o monitoramento de águas estuarinas quanto à presença
de compostos policíclicos genotóxicos**

Fábio Kummrow

Tese para obtenção do GRAU de
DOUTOR

Orientadora:
Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro

São Paulo - SP

2006

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011610

Ficha Catalográfica

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

K96t	<p>Kummrow, Fábio</p> <p>A técnica de blue rayon <i>in situ</i> associada ao teste salmonella/microsoma com estratégia para o monitoramento de águas estuarinas quanto à presença de compostos policíclicos genotóxicos / Fábio Kummrow. -- São Paulo, 2006.</p> <p>lv. (várias paginações)</p> <p>Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.</p> <p>Orientador: Umbuzeiro, Gisela de Aragão</p> <p>I. Toxicologia ambiental I. T. II. Umbuzeiro, Gisela de Aragão, orientador.</p> <p>615.9 CDD</p>
------	---

Fábio Kummrow

A técnica de Blue rayon *in situ* associada ao teste de Salmonella/microsoma como
estratégia para o monitoramento da águas estuarinas quanto à presença de
compostos policíclicos genotóxicos

Comissão Julgadora
Da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro
orientadora/presidente

Elizabeth de Souza Nascimento

Ernani Pinto Junior

José Eduardo Bevilacqua

Wilson de Figueiredo Jardim

São Paulo, 07 de março de 2006.

“Cumpre-nos fazer alguma coisa,
capaz de inflamar os que nos sucederem”

(Rui Barbosa)

Dedico este trabalho à memória dos meus avós
Oswaldo Fernandes, Leni e Victor Kummrow e à
minha querida amiga Jussara de Almeida Taveira

"Não devemos nos preocupar com que uma obra permaneça tal e qual é,
mas sim com que ela deixe sementes;
que espalhe sementes que façam nascer outras coisas"

(MIRÓ)

À minha "Chefe", Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro,
por ter me inspirado, orientado, acreditado em mim
e no nosso trabalho, toda a minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Odacira e Wieland, e à avó Estér por todo o apoio e incentivo indispensáveis para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Sem vocês nada disso seria possível.

Ao meu grande amor; Gabriela, por todo o carinho, compreensão, apoio e dedicação; fundamentais para eu concluir este trabalho.

À Fernanda, João e Marise que estiveram ao meu lado em todos os momentos.

Aos bons e velhos amigos Geraldo e Ana Filipa, Yin, Leonardo e Fátima, Paula, Dario e Cinthia, Danilo, Evelise e Zé por tornarem minha vida alegre e agradável.

À minha querida afilhada Carolina pelos momentos de alegria e tranquilidade.

Aos grandes amigos da CETESB, Coimbra, Célia, Gordela, Paulinho (em memória), Deborah, Viana, Genival, Ângela, Wallace, Paulo e à todos os estagiários do EAM que me ajudaram, ensinaram e conviveram durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos e companheiros do EAMT, Rúbia, Maria Helena, Gerson e Viviane por toda paciência, compreensão e incentivo.

Aos meus amigos da pós-graduação Danielle, Cláudia, Isarita, Simone, Maurício, Sônia, Tânia, Fabriciano, Daniela, Patrícia e todos os demais que sempre estiveram ao meu lado.

Aos professores e funcionários da disciplina de Toxicologia por terem tornado possível este trabalho.

Às Professoras Lilian e Pérola e seus alunos Alexandre e Dulce pela importante colaboração nesse trabalho.

À Deus por permitir que eu tenha uma vida tão maravilhosa e junto de pessoas fantásticas.

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

RESUMO

O estuário de Santos abriga o maior porto da América Latina e um dos maiores complexos industriais do Brasil. Na década de 1970 foi considerado um dos maiores exemplos de degradação ambiental em ambientes costeiros, e apesar da melhora na qualidade ambiental observada nos últimos anos algumas áreas deste estuário apresentam sedimentos ainda altamente contaminados com compostos tóxicos e genotóxicos, especialmente os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA). Operações de dragagem para manutenção das atividades portuárias são necessárias e conseqüentemente durante este processo pode ocorrer a ressuspensão de contaminantes presentes nesses sedimentos, tornando-os disponíveis novamente na coluna d'água. Desta forma é interessante ter uma estratégia eficiente e aplicável no monitoramento da qualidade dessas águas.

O Blue rayon (BR) é um adsorvente seletivo para compostos policíclicos com três ou mais anéis fundidos em sua molécula e tem sido utilizado com sucesso no monitoramento de HPA e atividade mutagênica em ambientes aquáticos. Este trabalho teve como objetivo padronizar o uso da técnica de Blue rayon *in situ* ancorado, onde as fibras são fixas a uma distância padronizada dos sedimentos, associada ao teste de Salmonella/microsoma em microcrossuspensão a ser aplicada no monitoramento das águas desse estuário.

Foram selecionados três pontos de amostragem com diferentes características e sedimentos com variados níveis de contaminação. As duas campanhas iniciais foram realizadas com o objetivo de avaliar a eficiência do BR e de escolher a linhagem de Salmonella mais sensível aos compostos mutagênicos possivelmente presentes nos extratos obtidos bem como verificar a presença de HPA. As cinco campanhas posteriores foram realizadas para verificar o comportamento e a eficiência da estratégia previamente definida no monitoramento das águas desse estuário utilizando experimentos de dose resposta.

Os resultados obtidos nas duas primeiras campanhas mostraram que as águas do ponto 1, que contém os sedimentos mais contaminados e recebe os efluentes da COSIPA, apresentam maior contaminação por HPA e atividade genotóxica mais elevada que o ponto 2. Também foi possível determinar que a linhagem de Salmonella YG1041 foi a mais sensível para detectar atividade

mutagênica tanto no ponto 1 quanto no ponto 2. Nas cinco campanhas subsequentes as maiores potências mutagênicas foram também observadas no ponto 1 com valores máximos de 5.100 e 36.000 revertentes/g de BR para a linhagem YG1041 na ausência e na presença de ativação metabólica (S9) respectivamente. Nos pontos 2 e 3 as potências observadas foram similares entre si, com valores em torno de 1.000 revertentes/g de BR.

Com base nos resultados obtidos nas duas etapas deste trabalho pode-se concluir que a o Blue rayon utilizado *in situ* a uma distância padronizada dos sedimento associado ao teste de Salmonella/microsoma em microssuspensão com a linhagem YG1041 na presença e na ausência de ativação metabólica (S9) é uma ferramenta que pode ser aplicada no monitoramento da qualidade do estuário de Santos.

ABSTRACT

Santos estuary is the major Latin American harbor and one of the largest industrial complex of Brazil. In the 1970s, it was considered one of the major examples of coastal degradation. Due to enforcement actions the quality of the environment has improved in the last years in relation to the chemical parameters and toxicity but unfortunately the sediment is still contaminated with toxic and genotoxic compounds especially Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). For the maintenance of the port activities sediment dredging is needed and during this process contaminants resuspension can occur, leading to the contamination of the water column. Therefore it is interesting to have an efficient strategy that can be used for the water quality monitoring of this area.

The Blue rayon is a selective adsorbent to polycyclic compounds containing three or more fused rings and has been successfully used in the monitoring of PAHs and mutagenic activity in aquatic environments. The objective of this work was to evaluate a modified blue rayon hanging technique, denominated in this work "Blue rayon anchored technique", where the fibers are placed at a fixed distance from the sediment, associated with the *Salmonella*/microsome microsuspension assay in order to monitor the water quality of Santos estuary.

Three sites with different sources and sediment contamination levels were selected in this study. Two initial samplings were performed in order to evaluate the efficiency of the BR modified technique and find the most sensitive strain of *Salmonella typhimurium* to the mutagens possibly present in the those waters as well as verify the presence of PAHs. Five subsequent samplings were performed to verify the performance and efficiency of the defined strategy in the estuary water quality monitoring using dose response experiments.

In the two initial samplings, the water from the site containing the most contaminated sediment and under influence of COSIPA (site 1) presented higher mutagenic activity and higher levels of PAHs. It was also possible to verify the highest sensitivity of the YG1041 strain in the detection of the mutagenic activity in both sites analyzed. In the subsequent five samplings, higher mutagenic potencies were again observed for site 1, reaching 5,100 and 36,000 revertants per gram of BR

for the YG1041 strain in the absence and presence of S9 respectively. Sites 2 and 3 presented similar potencies, around 1000 revertants per gram of BR.

Based on the obtained results we can conclude that the Blue rayon anchored technique associated with the Salmonella/microsome microsuspension assay with the YG1041 strain in the presence and absence of S9 is a suitable tool to monitor Santos estuarine waters.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O Estuário de Santos	1
1.2. Contaminação de estuários por compostos genotóxicos e Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos - HPA	8
1.3. Uso do Blue rayon na extração de mutágenos presentes em águas	17
2. OBJETIVO	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Material.....	20
3.1.1. Aparelhagem.....	20
3.1.2. Vidraria.....	21
3.1.3. Outros materiais.....	21
3.1.4. Reagentes.....	22
3.1.5. Meios de cultura e soluções.....	24
3.1.6. Esterilização e teste de esterilidade.....	27
3.1.7. Lavagem de vidraria.....	28
3.2. Métodos.....	28
3.2.1. Pontos de amostragem	28
3.2.2. Procedimento de amostragem	30
3.2.3. Preparo dos extratos orgânicos	31
3.2.4. Fracionamento dos extratos	32
3.2.5. Ensaio de Salmonella/microsoma em microcrossuspensão	33
3.2.5.1. Preparo da placa-mãe	36
3.2.5.2 Taxa de reversão espontânea	37
3.2.5.3 Procedimento do ensaio	38
3.2.5.3.1 Protocolo de microcrossuspensão	38
3.2.5.4 Interpretação de resultados e análises estatísticas	40
3.2.6. Análises cromatográficas	41
4. RESULTADOS	43
5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
7. ANEXOS.....	60

Anexo 1 - Evaluation of the water genotoxicity from Santos Estuary (Brazil) in relation to the sediment contamination and effluent discharges (artigo publicado na revista Environment International)

Anexo 2 - Uso do Blue rayon para a extração/concentração de compostos policíclicos em amostras ambientais (artigo publicado na revista Química Nova)

Anexo 3 - Blue rayon e teste Salmonella/microsoma na avaliação da qualidade de águas costeiras (Artigo submetido)

Anexo 4 - Blue rayon anchored technique/Salmonella microsome microsuspension assay as a tool to monitor for genotoxic polycyclic compounds in Santos estuary (Artigo submetido)

Anexo 5 - Informações para os Membros de Banca Julgadora de Mestrado/Doutorado

LISTA DE ABREVIATURAS

Anova – Análise de variância

BHC – Hexaclorociclohexano

BR – Blue rayon

COSIPA – Companhia Siderúrgica Paulista

DNA – Ácido desoxiribonucleico

HCB – Hexaclorobenzeno

HPA – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

LD – Limite de detecção do método analítico

LQ – Limite de quantificação do método analítico

PCB – Bifenilas policloradas

RM – Razão de mutagenicidade

1. INTRODUÇÃO:

1.1 O ESTUÁRIO DE SANTOS

Estuários são ecossistemas dinâmicos e produtivos, além de serem áreas de imenso valor ecológico, ambiental e econômico. Algumas áreas costeiras são vitais para atividades comerciais, de transporte e de recreação (HU e col. 2004) e a compreensão do transporte e da distribuição dos contaminantes nestas áreas é muito importante pois estas regiões recebem grande carga de poluentes e a biota é muitas vezes utilizada como fonte de alimentos (COUNTWAY e col. 2003).

Das 25 regiões metropolitanas que o Brasil possui, 14 estão localizadas em estuários onde estão situados também os principais pólos petroquímicos e sistemas portuários que ao longo dos anos acabaram sendo responsáveis por significativa degradação desses ecossistemas (CETESB 2001). Entre os principais problemas de poluição em áreas costeiras no Brasil, estão a industrialização, a urbanização, a extração e transporte de petróleo, o esgoto doméstico sem tratamento adequado, os efluentes industriais e ainda o transporte de contaminantes por escoamento de áreas urbanas e agrícolas (NIPPER 2000). Dentre estes os efluentes industriais líquidos são a maior fonte de contaminantes químicos de origem antrópicas lançados nos cursos d'água, sendo freqüentemente o fator mais significativo em termos de poluição hídrica (COELHO 1995).

O estuário de Santos está localizado no sudeste do estado de São Paulo e é uma das mais importantes áreas econômicas deste estado. Santos abriga o maior porto comercial da América Latina e um dos maiores complexos industriais petroquímicos e metalúrgicos do Brasil (MEDEIROS e BÍCEGO 2004). A localização estratégica da bacia do Rio Cubatão, a qualidade de suas águas e a disponibilidade energética foram fatores que determinaram a instalação do pólo industrial na região da Baixa Santista (PASCHOAL 1996), e a partir de 1950 ocorreu a implantação de diversas indústrias de base com alto potencial poluidor, fazendo desta região de estuário um grande receptor de resíduos tóxicos e efluentes líquidos contaminados (CETESB 2001).

Tanto a industrialização como o crescimento urbano desordenados, associados às condições climáticas e topográficas inadequadas para a dispersão de

poluentes, e a inexistência de um programa de controle das emissões no passado desencadearam o processo de degradação ambiental que foi evidenciado, principalmente, pela destruição da mata nas encostas da Serra do Mar, deterioração dos corpos d'água e no comprometimento da saúde da população desta região (PASCHOAL 1996).

Alguns dos problemas de saúde pública observados na Baixada Santista estão ligados a maior mortalidade por câncer observada principalmente na área portuária e industrial em relação às áreas não industrializadas desta mesma região. Na área industrializada a taxa de mortalidade foi 209,2 por 100.000 habitantes enquanto na área não industrializada, a taxa foi de 146,7 por 100.000 habitantes (estas taxas foram obtidas através da análise de 8.546 óbitos por câncer ocorridos no período entre 1980 a 1993) (FARIA e col. 1999), ambas acima das taxas de mortalidade que ocorrem em outras regiões do estado de São Paulo. FARIA e col. (2001) sugerem que o excesso de câncer observado está relacionado a exposição ocupacional e ambiental a compostos carcinogênicos presentes no complexo industrial e na área portuária como, por exemplo, os hidrocarbonetos aromáticos, organoclorados, compostos nitrogenados e metais.

A ocorrência de contaminantes químicos com capacidade de causar danos ao DNA no meio ambiente representam uma ameaça a saúde humana, bem como para a saúde do ecossistema (KLEINJANS e VanSHOOTEN 2002). Os compostos genotóxicos são aqueles capazes alterar o material genético dos organismos podendo causar mutações (BRUSICK e col. 1992) tanto em células germinativas e/ou somáticas levando ao câncer, doenças hereditárias ou outros processos degenerativos crônicos como angina e doenças coronárias (DEARFIELD e col. 2002).

Desde 1974 a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) realiza estudos no estuário e na baía de Santos com o objetivo de avaliar as condições ambientais da área (CETESB 1981) e muitos trabalhos visando a avaliação da qualidade ambiental deste estuário já foram realizados (CETESB 1981; CETESB 1986; CETESB 1990).

No estudo de 1981 (CETESB 1981), realizado na década de 1970, foi verificado que havia baixa contaminação por Cádmio (sem fontes evidentes deste

metal), e concentrações elevadas de Zinco quando comparadas à outros estuários ao redor do mundo. Verificou-se também a contaminação das águas, sedimentos e biota por Mercúrio. Uma redução da emissão de alguns poluentes industriais (metais pesados e carga orgânica) para o ambiente aquático na Baixada Santista, foi observada a partir de meados da década de 1980, e esta foi resultante principalmente da implantação de sistemas de controle de poluição, desativação de plantas industriais obsoletas, modernização tecnológica e ao aumento do nível de recirculação da água utilizada no processo produtivo. A primeira etapa do Programa de Controle da Poluição Ambiental em Cubatão, desenvolvido pela CETESB, foi encerrada em 1989 e reduziu 89% das 320 fontes de poluição autuadas, o que diminuiu significativamente a ocorrência de episódios críticos de poluição do ar e permitiu o reaparecimento dos peixes e outros organismos aquáticos nesta região. Porém o reaparecimento dos peixes e demais organismos aquáticos na bacia do rio Cubatão não indica, por si só, uma recuperação total dos corpos d'água, uma vez que alguns compostos químicos, entre eles os metais, os organoclorados e os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) podem persistir no ambiente e, principalmente, nos sedimentos, por longos períodos (PASCHOAL 1998).

Em 1990, em outra abrangente avaliação da contaminação da região da Baixada Santista realizada pela CETESB, as águas deste estuário ainda apresentaram contaminação por metais (cádmio, chumbo, cromo, ferro, mercúrio e zinco) e praguicidas (BHC, hexaclorobenzeno e lindano), em concentrações que apresentavam riscos potenciais para a preservação da vida aquática. Solventes orgânicos também foram determinados nas águas, porém apenas o tetracloreto de carbono e o tetracloroetileno apresentaram concentrações acima dos padrões recomendados para a preservação da vida aquática. Em alguns pontos de amostragem os sedimentos foram considerados como altamente contaminados por arsênio, chumbo, mercúrio e zinco. O hexaclorobenzeno foi encontrado em todas as amostras de sedimentos analisadas. Óleos e graxas foram observados em algumas amostras tanto de água quanto de sedimento desta região (CETESB 1990).

Já no estudo realizado pela CETESB em 2001 foi verificado que nas águas, do estuário da Baixada Santista, houve uma significativa redução nas concentrações de alguns contaminantes avaliados, entre eles o HCB e BHC, quando comparadas

aos estudos anteriores (CETESB 1990). Para o chumbo, cádmio, mercúrio e zinco não foram observadas alterações em relação ao estudo realizado em 1990 (CETESB 2001). Ainda nas águas não foram detectados cromo, solventes aromáticos (exceto benzeno), solventes halogenados (exceto clorofórmio), praguicidas organoclorados (exceto endosulfan B), organoclorados aromáticos e compostos fenólicos em concentrações variáveis. Poluentes pouco solúveis (PCB e HPA) não foram encontrados nas amostras de água. Neste estudo, pela primeira vez, foram analisados HPA em amostras de água deste estuário porém, as concentrações dessa classe de compostos foram inferiores ao limite de detecção da técnica utilizada (entre 0,1 e 1,0 µg/L) (CETESB 2001).

A maior parte dos contaminantes ambientais genotóxicos, como os HPA, são lipofílicos e nos ambientes aquáticos podem se acumular ou concentrar nos organismos aquáticos, algumas vezes em fatores de 10^3 - 10^6 , facilitando o seu biomonitoramento. A maioria dos estudos com organismos aquáticos tem sido realizado com peixes, e os HPA são os contaminantes genotóxicos mais avaliados. Os HPA precisam ser biotransformados para formar metabólitos que podem se ligar ao DNA e assim produzir adutos de DNA. Os peixes formam o mesmo tipo de adutos que os mamíferos, porém em geral os mamíferos biotransformam os HPA mais rapidamente que os peixes (KLEINJANS e VanSCHOOTEN 2002). Esta classe de contaminantes ambientais é absorvida pelos organismos aquáticos diretamente da água (pelo contato com a superfície corpórea ou com as guelras) ou através da dieta, porém alguns trabalhos têm sugerido que a exposição através da dieta é menos relevante que a direta através da água (HYLLAND 2006).

Organismos aquáticos do estuário de Santos foram avaliados pela CETESB em 2001, nos pontos de coleta analisados neste estudo e contaminação por HPA foi observada em algumas espécies. No ponto localizado próximo à COSIPA (equivalente ao ponto 1 deste trabalho) os siris analisados (*Callinectes sapidus*) apresentaram HPA totais em concentração máxima de 168 µg/kg, os robalos (*Centropomus sp*), 70 µg/kg, as carapebas (*Diapterus rhombeus*), 69 µg/kg, as tainhas (*Mugil sp*), 268 µg/kg e os caranguejos (*Ucides cordatus*), 384 µg/kg. No ponto localizado próximo a Ilha do Caneus (equivalente ao ponto 2 deste trabalho) os caranguejos apresentaram concentração máxima de 176 µg/kg, as tainhas de

136 µg/kg, as carapebas de 109 µg/kg, os robalos de 147 µg/kg, os siris de 157 µg/kg e as ostras (*Crassostrea sp*) de 1564 µg/kg. E no ponto localizado no Rio Queiroz (equivalente ao ponto 3 deste trabalho) as carapebas apresentaram concentração máxima de 5 µg/kg, os caranguejos de 187 µg/kg, as tainhas de 108 µg/kg e os siris de 148 µg/kg. No referido estudo as ostras, que são organismos filtradores, foram os organismos que apresentaram as maiores concentrações de HPA totais. Esses moluscos são organismos amplamente adotados como bioindicadores para a contaminação por esta classe de compostos pois concentram rapidamente HPA e tem baixa capacidade de biotransformá-los (CETESB 2001).

Os efluentes líquidos industriais de grandes empresas da região da Baixada Santista (Petrobrás, COSIPA, Carbocloro, Companhia Brasileira de Estireno, Companhia Santista de Papel e TITANOR) foram avaliados quanto a sua genotoxicidade e toxicidade aguda ainda na década de 1980. Estes efluentes apresentaram atividade mutagênica frente às linhagens de *Salmonella typhimurium* do teste de Ames (*Salmonella/microsoma*) TA98 e TA1535 principalmente na presença do sistema ativação metabólica (mistura S9). Foi observado também alto grau de toxicidade aguda frente ao teste com *Spirillum volutans* nas amostras de efluentes avaliadas (CETESB 1986).

BARRETO 1995, avaliou também a genotoxicidade (Ensaio *Salmonella/microsoma*) e a toxicidade aguda (*Vibrio fischeri* - Sistema Microtox) de efluentes da usina siderúrgica (COSIPA) situada neste estuário. Em relação ao teste de toxicidade aguda foi observado que os sólidos suspensos presentes nos efluentes estavam associados à toxicidade detectada. Em relação à genotoxicidade extratos orgânicos destes efluentes, obtidos pela técnica de extração Líquido/Líquido, apresentaram resultados positivos para o teste de *Salmonella/microsoma* apenas na presença de S9, sendo que duas amostras apresentaram atividade mutagênica moderada (93.000 e 18.000 revertentes/L) e uma alta (169.000 revertentes/L) de acordo com a classificação de HOUK (HOUK 1992). Neste caso a mutagenicidade também estava associada ao material suspenso pois quando estes efluentes eram filtrados, resultados negativos eram obtidos (BARRETO 1995). Esses resultados sugerem que HPA não substituídos poderiam ser responsáveis pelos efeitos observados.

Ainda com relação aos efluentes da mesma usina siderúrgica (COSIPA), UMBUZEIRO e col. (2006) (Anexo 1) realizaram análises para a detecção/quantificação de HPA, tanto no material em suspensão quanto no filtrado do efluente desta indústria, e observaram que praticamente todo o conteúdo de HPA da amostra, estava associado aos sólidos suspensos corroborando os resultados obtidos por BARRETO em 1995 (BARRETO 1995).

UMBUEIRO e col. (2006) (Anexo 1), analisando amostras de água dos mesmos pontos do estuário onde os HPA não haviam sido detectados (CETESB 2001) observaram atividade genotóxica baixa em apenas dois dos pontos de coleta, sendo um deles o ponto que apresentou nos sedimentos as maiores concentrações de HPA (CETESB 2001) e também alta atividade genotóxica (ROUBICEK 2003).

Nos sedimentos, os HPA, podem estar em concentrações até 1000 vezes superiores que as encontradas na coluna d'água, e em áreas que recebem efluentes industriais os sedimentos podem apresentar um total de HPA da ordem de centenas de mg/kg enquanto em áreas remotas (sem atividades industriais) as concentrações encontram-se na faixa de poucos $\mu\text{g/kg}$. No ponto mais contaminado do estuário de Santos, sob influência dos efluentes da COSIPA, foi observada concentração média dos HPA totais de 325 $\mu\text{g/g}$ peso seco (CETESB 2001).

ROUBICEK 2003 avaliando os sedimentos da Baixada Santista, através do teste de Salmonella/microsoma com as linhagens TA98 e TA100 na presença e na ausência de mistura S9 detectou apenas dois pontos de amostragem que apresentaram resultados positivos. Um ponto, localizado no Rio Cubatão, que apresentou fraca mutagenicidade apenas frente a linhagem TA98 na presença de S9 (170 revertentes/g de sedimento peso seco) e o outro ponto, localizado sob influência direta do lançamento do efluente da COSIPA onde a atividade mutagênica foi detectada com ambas as linhagens tanto na presença como na ausência de S9. Para a TA98 os valores máximos obtidos foram 4.400 e 63.000 revertentes/g de sedimento peso seco. Para a TA100 os valores foram de 63.000 e 610.000 revertentes/g de sedimento peso seco na presença e na ausência de S9 respectivamente. Esta elevação observada na presença de S9 e os valores mais elevados para a TA100 sugerem que HPA não substituídos poderiam estar contribuindo para o efeito observado, fato corroborado pelos resultados analíticos

(ROUBICEK 2003).

Em outro trabalho, os sedimentos da região estuarina da Baixada Santista, foram analisados também pelo teste de Salmonella/microsoma. Os locais avaliados foram o ponto A próximo a companhia siderúrgica (equivalente ao ponto 1 deste trabalho), o ponto B localizado no Rio Piaçaguera e o ponto C no Rio Queiroz (equivalente ao ponto 3 deste trabalho). O ponto A apresentou as maiores potências para as linhagens TA98, de 17.000 e 74.000 revertentes/g de sedimento peso seco e TA100 de 290.000 e 340.000 na presença e na ausência de ativação metabólica (S9) respectivamente. No ponto B menor atividade mutagênica foi observada, tendo sido apenas detectada apenas com a linhagem TA98 na presença e na ausência de S9 nos mesmos níveis (2.000 e 2.000 revertentes/g de sedimento peso seco respectivamente) e o ponto C não apresentou atividade mutagênica. No ponto A o aumento da atividade mutagênica na presença de S9 sugere que HPA não substituídos poderiam ser os causadores desse efeito. Neste trabalho foi também avaliada a toxicidade aguda dos sedimentos através do teste com *Vibrio fischeri* (Microtox) e apenas o ponto A apresentou toxicidade para este teste (UMBUZEIRO e col. 2004a).

São dragados hoje na região do Porto de Santos aproximadamente 3 milhões de m³/ano de sedimento para manutenção das atividades portuárias. Esses procedimentos, quando feitos em locais contaminados podem gerar graves problemas ambientais. Sabe-se que o sedimento é uma importante fonte de contaminação da coluna d'água, especialmente quando os mesmos são ressuspensos (ex.: por atividades de navegação e dragagem) (NIPPER 2000; CHEN e WITHE 2004).

Na região do estuário de Santos, nos dias de hoje pode-se observar uma significativa melhora na qualidade das águas em relação aos contaminantes avaliados, porém, os sedimentos ainda apresentaram altas concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e outros contaminantes tóxicos e/ou genotóxicos (CETESB 2001; NISHIGIMA e col. 2001; MEDEIROS e BÍCEGO 2004). Atividade genotóxica, avaliada por meio do teste com Salmonella-microsoma foi observada em amostras de sedimentos dos locais mais impactados (ROUBICEK 2003). NISHIGIMA e col. (2001) encontraram concentrações de HPA variando entre

0,08 e 42,39 $\mu\text{g/g}$ de sedimento (peso seco) em pontos de amostragem localizados na região de Santos, e no estudo realizado pela CETESB (CETESB, 2001) a concentração média encontrada no ponto mais contaminado foi de 325 $\mu\text{g/g}$ de sedimento.

Muitos trabalhos investigaram a presença e a origem dos HPA em estuários mas normalmente estes compostos são avaliados apenas nos sedimentos e nos organismos justamente por causa das suas características físico-químicas (KUCKLICK e col. 1997; NISHIGIMA e col. 2001; MASKAOUI e col. 2002; MATTHIESSEN e LAW 2002; WALKER e col. 2005). Porém a verificação das concentrações destes contaminantes na coluna d'água é importante para se avaliar a real exposição da biota aquática (HELLOU e col. 2005). Para isso são alternativas aumentar a sensibilidade dos métodos empregados permitindo a determinação de concentrações baixas desses contaminantes nas águas ou ainda utilizar biomarcadores de genotoxicidade em espécies residentes, que podem ser em muitos casos, ainda mais sensíveis que as análises químicas.

No próximo item (1.2) será apresentada uma revisão da literatura da internacional sobre mutagenicidade e presença de HPA em águas estuarinas, excetuando-se os trabalhos já apresentados neste item (1.1).

1.2 CONTAMINAÇÃO DE ESTUARIOS POR COMPOSTOS GENOTÓXICOS E HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS - HPA

As águas superficiais são contaminadas constantemente por grande quantidade e variedade de compostos químicos, provenientes de várias fontes, como por exemplo, atividades industriais, agrícolas e domésticas (VALENT 1990). Os contaminantes presentes nas águas e nos sedimentos dos estuários podem ser tóxicos e/ou genotóxicos e ter diferentes características químicas e, numa classificação preliminar, podem ser divididos em poluentes orgânicos, inorgânicos e espécies metálicas. Dentre esses contaminantes os compostos orgânicos são os que apresentam maiores dificuldades em relação a sua avaliação, devido a enorme variedade de classes potencialmente presentes no meio ambiente, além dos seus

inúmeros produtos de transformação biótica e abiótica.

Estudos para verificar a presença de contaminantes orgânicos genotóxicos em ambientes costeiros, especialmente em sistemas estuarinos, são muito importantes devido à alta produtividade e as grandes quantidades de poluentes provenientes da drenagem terrestre que estas áreas recebem (NISHIGIMA e col. 2001). Porém analisar quimicamente todos os contaminantes genotóxicos e seus produtos de transformação no meio ambiente é uma tarefa bastante complexa, e por isso bioensaios têm sido utilizados com sucesso para complementar as análises químicas na caracterização da qualidade das águas e dos sedimentos (UMBUZEIRO e col. 2001; CHEN e WHITE 2004; OHE e col. 2004).

O teste mais utilizado para verificar a presença de compostos com atividade mutagênica em ambientes aquáticos, tanto nas águas quanto nos sedimentos, é o teste de *Salmonella*/microsoma (teste de Ames) (OHE e col. 2004; CHEN e WHITE 2004). No artigo de revisão publicado por OHE e col. 2004, sobre mutagenicidade de águas superficiais, 37% dos dados encontrados na literatura internacional foram obtidos por este ensaio e a principal estratégia utilizada é a combinação das linhagens de *Salmonella* TA98 e TA100 na presença e ausência de ativação metabólica (S9). O trabalho mostra também que quando um significativo aumento na resposta mutagênica é detectada com linhagens que possuem alta produção das enzimas nitro-redutase e acetiltransferase (ex.: YG1041 e YG1042) em relação às linhagens parentais (TA98 e TA100) na presença de S9 pode-se sugerir a presença de mutágenos da classe das aminas aromáticas e na ausência de S9 a presença de nitro-compostos (OHE e col. 2004).

Para os sedimentos, CHEN e WHITE 2004 verificaram que 41,1% dos dados de mutagenicidade encontrados na literatura internacional também foram obtidos por meio do teste de Ames, e neste estudo foi verificado que há uma correlação empírica entre a potência mutagênica observada através do teste de *Salmonella*/microsoma realizado com as linhagens TA98 e TA100 na presença de S9, e a presença de HPA não substituídos (ex.: Benzo(a)pireno).

Dentre os contaminantes com atividade genotóxica a classe dos HPA é considerada uma das mais importantes. Eles são contaminantes ubiqüitários encontrados no ar, solo e águas. Estes compostos são gerados tanto por fontes naturais como antrópicas, sendo as atividades antrópicas as principais responsáveis

pela presença dos HPA nos compartimentos ambientais (DABASTANI e IVANOV 1999). Esta classe de compostos é caracterizada por possuir dois ou mais anéis aromáticos condensados (NETTO e col. 2000) e por serem hidrofóbicos. O HPA são gerados através de síntese por bactérias, plantas e fungos ou durante a queima incompleta de matéria orgânica, naturalmente presentes no meio ambiente (ex.: incêndios florestais naturais) ou relacionados a um série de atividades humanas destacando-se a produção de carvão coque e gás, indústrias petroquímicas e produção e derramamentos de óleos combustíveis (QUANTIN e col. 2005). Na Baixada Santista os contaminantes de maior preocupação são os HPA, como já apresentado no item 1.1. Segundo CAO e col. 2005, a maioria das avaliações da contaminação por HPA em corpos d'água tem sido realizadas na América do Norte e na Europa, em países como Estados Unidos, Canadá, Alemanha, Inglaterra, França, Grécia entre outros. Informações sobre a poluição das águas por HPA na Ásia tem sido relatadas em países como a Coreia, Malásia e China.

Dentre estes trabalhos, a maioria apresenta resultados de águas salinas e estuarinas. Devido à persistência e ao potencial mutagênico/carcinogênico de vários HPA e seus derivados, estudos das fontes/origem, ocorrência, transporte e comportamento destes compostos nos compartimentos ambientais têm sido freqüentemente realizados (NETTO e col. 2000; ZHU e col. 2004). Entre estes compostos os que apresentam regiões de baía em sua estrutura, como o Benzo(a)pireno e o Fenantreno, são os que mostraram maior reatividade bioquímica (ALMEIDA 2003).

A solubilidade dos HPA em águas, especialmente as salinas é muito baixa e diminui com o aumento do peso molecular destes compostos. Normalmente estes compostos encontram-se associados aos sólidos em suspensão, dispersos na fase coloidal ou como material dissolvido que tende a se depositar nos sedimentos (NISHIGIMA e col. 2001; COUNTWAY e col. 2003; HYLLAND 2006). A partição relativa entre as frações dissolvida, coloidal e ligada aos sólidos em suspensão difere de acordo com o peso molecular e com o coeficiente de partição óleo/água (K_{ow}) (HYLLAND 2006). Nos sedimentos os HPA estão entre os mais abundantes contaminantes orgânicos (TABAK e col. 2003). Sua persistência no meio ambiente esta ligada a sua massa molecular sendo os HPA com baixas massas degradados

mais facilmente. Enquanto o naftaleno e o antraceno apresentam tempo de meia vida nos sedimentos de 9 e 43 horas respectivamente, HPA de massas elevadas apresentam tempos de meia vida em solos e sedimentos de alguns anos (ALMEIDA 2003).

Com relação à toxicidade, aqueles de menor massa molecular apresentam maior toxicidade aguda enquanto os com maior massa são mais genotóxicos, tanto para o homem como para os peixes e outros organismos (Figura 1). Estes compostos somente se tornam genotóxicos após sua biotransformação, quando são produzidos intermediários reativos que se ligam covalentemente ao DNA. Os fatores de concentração nos HPA em organismos aquáticos têm relação direta com os valores de Kow (que variam entre 4,8 a 8,2) e freqüentemente variam entre 100-2000, decrescendo com o aumento do tamanho molecular (ALMEIDA 2003). Os mecanismos dos efeitos tóxicos não carcinogênicos destes compostos têm sido menos estudados porém existem trabalhos que demonstram que eles podem causar estresse oxidativo, efeitos sobre o sistema imunológico, alterações na regulação endócrina e alterações no desenvolvimento de espécies aquáticas. Um outro mecanismo de toxicidade dos HPA e dos compostos heterocíclicos é a fototoxicidade. Estudos com organismos aquáticos indicam que a exposição à radiação ultravioleta (UV) ou aos raios solares podem aumentar drasticamente a toxicidade dos HPA (HYLLAND 2006).

A exposição humana direta aos HPA presentes nos sedimentos estuarinos é mínima, contudo sua presença nos sedimentos pode prejudicar os ecossistemas aquáticos e a saúde humana, pois durante operações de dragagem estes compostos podem se tornar novamente biodisponíveis podendo ser assim transferidos ao longo da cadeia alimentar (TABAK e col. 2003). A presença de HPA em sedimentos dragados pode resultar na classificação deste material como resíduo perigoso, para o qual tratamento apropriado pode ser necessário antes da disposição (TABAK e col. 2003). Tanto nos sedimentos como nos solos os HPA são lentamente biotransformados por fungos e bactérias podendo gerar algumas vezes compostos mais mutagênicos e com maior solubilidade em água (UMBUZEIRO e col. 2004a; DONNELLY e col. 2005), podendo causar contaminação da coluna d'água.

Figura 1: Estruturas químicas de alguns Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) tóxicos e/ou genotóxicos.

Naftaleno

Acenafteno

Acenaftileno

Fluoreno

Antraceno

Fenantreno

Fluoranteno

Criseno

Benzo(a)antraceno

Pireno

Benzo(k)fluoranteno

Benzo(b)fluoranteno

Benzo(a)pireno

Dibenzo(a,h)antraceno

Dibenzo(b,c)fluoranteno

Benzo(g,h,i)pirileno

A dessorção dos compostos orgânicos dos sedimentos ocorre em dois estágios, uma fração lábil, que dessorve rapidamente, e uma fração refratária que dessorve muito mais lentamente. Em sedimentos mais de 75% do benzo(a)pireno foi observado na fase refratária, enquanto apenas pequenas quantidades de fenantreno e pireno foram encontradas nesta fase (REEVES e col. 2004). Alguns autores demonstraram que uma significativa porção de HPA de maior massa molecular permanecem irreversivelmente ligados aos sólidos suspensos que se depositam nos sedimentos (CONWAY e col. 2003).

SHOR e col. (2004) analisaram sedimentos contaminados por HPA do estuário de Nova Iorque/Nova Jérsei. Nas amostras de sedimentos avaliados, os HPA menores e menos hidrofóbicos eram mais rapidamente e amplamente dessorvidos enquanto os maiores e mais hidrofóbicos tendiam a se dessorver mais lentamente. Os autores consideram importante se considerar o tamanho da fração residual dos HPA no sedimento durante o processo de avaliação de risco, em uma área contaminada, pois a maior parte dessa fração pode não estar biodisponível e portanto não estariam contribuindo para o risco de exposição dos organismos aquáticos e do homem. Neste estudo foram observadas concentrações de HPA nos pontos denominados Newtown Creek e Piles Creek de 35 e 21 mg/kg de sedimento respectivamente. Os HPA menores que 4 anéis não foram determinados neste estudo pois não têm contribuição importante para a carcinogênese (SHOR e col. 2004).

VENTURINI e col. (2004) analisaram HPA em sedimentos da Baía de Todos os Santos, no estado da Bahia (Brasil), e verificaram que o somatório das concentrações destes compostos variou de 8 a 4163 $\mu\text{g/kg}$ de sedimento (peso seco), sendo as maiores concentrações observadas nos pontos de amostragem situados nas adjacências de uma refinaria de petróleo. Neste estudo foi ainda observada uma correlação positiva entre as concentrações dos HPA e o conteúdo de carbono orgânico dos sedimentos. Os autores concluíram ainda que a contaminação por HPA desta região está ligada tanto a fontes pirogênicas (combustão de matéria orgânica) quanto petrogênicas (combustíveis de petróleo).

Recentemente GUZZELLA e col. 2005, avaliaram uma série de poluentes

orgânicos persistentes (POPs), entre eles o hexaclorociclohexano e seus isômeros, DDT e seus metabólitos, hexaclorobenzeno e compostos relacionados, PCBs e HPA no sedimento do estuário de West Bengal, na Índia. Em relação aos HPA os autores observaram que o Fluoranteno e o Pireno (HPA com 4 anéis e mais dominantes na mistura) apresentaram uma maior concentração nas proximidades de Babughat, local situado nas imediações da região metropolitana de Calcutá, com valores de 214 e 144 $\mu\text{g/kg}$ de sedimento (peso seco), respectivamente. Foram identificados 19 HPA e entre eles os predominantes foram Fluoranteno, Pireno, 1,2-Benzo(a)antraceno e Criseno. As atividades humanas foram identificadas como principais fontes de contaminação do estuário estudado, com destaque para o lançamento de efluentes domésticos e industriais. Os autores consideram que estes dados iniciais podem ser considerados como o início de um estudo de monitoramento ambiental desta região estuarina.

FERNANDES e col. (1997) determinaram HPA de 3-6 anéis fundidos, em amostras de águas e sólidos suspensos coletadas no Rio Sena e no seu estuário, e verificaram grande variação temporal e espacial nos conteúdos destes contaminantes com concentrações máximas de 687 ng/L e mínimas de 2 ng/L. Neste estudo os autores explicam esta grande variação pelo transporte e pela mistura das águas marinhas e doces, sendo que as águas com baixa salinidade foram as que apresentaram as maiores concentrações de HPA. O somatório dos HPA dissolvidos nas águas deste estuário (20 ± 13 ng/L) representaram em média 10% das concentrações encontradas nos sólidos suspensos. As maiores concentrações de HPA verificadas neste estudo foram obtidas na região mais industrializada e nas proximidades do Porto de Vieux.

ROSS & OROS (2004) determinaram a composição da mistura de HPA em uma faixa espacial e em escala temporal em amostras de coluna d'água do Estuário de São Francisco nos Estados Unidos no período de 1993 a 2001 com o objetivo de determinar a distribuição, as tendências e as possíveis fontes destes compostos. Foram investigados 25 diferentes HPA e a distribuição média do somatório destes compostos foi no Extremo Sul da Baía (120 ng/L) > Sul da Baía (49 ng/L) > Norte da Baía (12 ng/L) > Centro da Baía (49 ng/L) > Delta (7 ng/L). Esta distribuição foi atribuída a grande urbanização e industrialização observada no sudeste do Estuário

e que pelo tipo de isômeros encontrados a principal fonte dos HPA presentes nestas águas seria a combustão incompleta de petróleo.

Na coluna d'água do estuário do Rio Pearl, sul da China, HPA foram determinados tanto na sua fração solúvel quanto associado as partículas sólidas em suspensão. Foram avaliadas amostras de 10 L de água coletadas no Rio Pearl, em um local denominado Baiertang e no porto de Macao. Estas amostras foram inicialmente filtradas em fibra de vidro para separação dos sólidos suspensos e em seguida o filtrado obtido foi submetido a extração/concentração em colunas de resina XAD. Na fração das partículas sólidas em suspensão foram observadas concentrações de HPAs totais variando entre 0,16 e 0,43 $\mu\text{g/L}$ para as amostras do ponto Baiertang e 0,09 e 0,26 $\mu\text{g/L}$ para as amostras do porto de Macao. Na fração solúvel as concentrações variaram entre 0,70 e 2,58 $\mu\text{g/L}$ em Baiertang e 0,69 e 6,46 $\mu\text{g/L}$ em Macao. Este estudo também demonstrou que a totalidade dos HPA maiores (de 4 a 6 anéis) estava praticamente associada ao material particulado nas regiões mais profundas da coluna d'água (LOU e col. 2004).

ZHU e col. (2004) avaliando a presença de HPA nas águas de 5 corpos d'água em Hangzhou (China) verificaram significativa variação nas concentrações máximas no mês de julho (34,4 - 67,7 $\mu\text{g/L}$) em relação ao mês de novembro (4,7 - 15,3 $\mu\text{g/L}$) e as principais fontes atribuídas foram a deposição atmosférica e o escoamento de solos.

MASKAOUI e col. (2002) avaliaram a contaminação por 16 diferentes HPA no estuário do rio Jiulong na China nas águas, sedimento e água intersticial. A concentração de HPA foi mais elevada no sedimento variando entre 59-1.177 $\mu\text{g/kg}$ de sedimento (peso seco), seguido da água intersticial com concentrações entre 158-949 $\mu\text{g/L}$ e menores concentrações nas águas 6,9-26,9 $\mu\text{g/L}$. Neste trabalho foi observado também um predomínio de HPA de alta massa molecular, em particular os de 5 anéis. A análise dos HPA nas amostras de água foram realizadas após extração em fase sólida em colunas.

Em outro estudo realizado na China, no estuário do rio Minjiang, 16 HPA considerados prioritários também foram avaliados nas águas, água intersticial e sedimento e as concentrações totais encontradas destes compostos variaram entre

9,9 a 474 $\mu\text{g/L}$, 82 a 239 $\mu\text{g/L}$ e 112 a 877 $\mu\text{g/kg}$ (peso seco) respectivamente. Em média as concentrações de HPA presentes na água intersticial foram maiores que aquelas observadas na coluna d'água, como também observado por MASKAOUI e col. 2002 (ZHANG e col. 2004).

Levando-se em conta que os HPA de maior massa molecular são normalmente mais genotóxicos, apresentam maior persistência nos solos e sedimentos e uma vez presentes no sedimento podem ser fonte de contaminação para coluna d'água (ex.; ressuspensão) é possível que em locais com altas concentrações deste compostos nos sedimentos as águas apresentem atividade mutagênica e concentrações detectáveis desta classe de compostos. Porém há dificuldades no desenvolvimento de métodos e estratégias que facilitem essas avaliações e consequentemente o monitoramento das águas estuarinas (HU e col. 2004).

Tanto os HPA como outras classes importantes de contaminantes tóxicos e/ou genotóxicos podem estar presentes nas águas estuarinas e sua identificação bem como seu adequado monitoramento são muito importantes para uma avaliação abrangente da qualidade ambiental destas regiões. Assim novos métodos seletivos de extração/concentração de amostras são necessários tornando assim possível a verificação de baixos níveis de concentração desses poluentes na coluna d'água. (FERRER e BARCELÓ 1999). Uma destas novas técnicas, que pode ser muito útil para a extração/concentração dos HPA presentes na coluna d'água em ambientes aquáticos como os estuários, é a de Blue rayon *in situ* (KIRA e col. 1995).

No próximo item (1.3) será apresentada uma revisão da literatura sobre a utilização do Blue rayon na extração/concentração de compostos policíclicos presentes em ambientes aquáticos.

1.3 USO DO BLUE RAYON NA EXTRAÇÃO DE MUTÁGENOS PRESENTES EM ÁGUAS

Em 1983 foi descoberto que fibras de algodão ligadas covalentemente ao pigmento ftalocianina de cobre tiosulfato, denominadas Blue Cotton, formavam um adsorvente seletivo para compostos policíclicos (HAYATSU e col. 1983; HAYATSU e col. 1996). Essa descoberta foi baseada em estudos que mostraram que o Heme presente na molécula pode inibir a atividade mutagênica se ligando a mutágenos policíclicos com estrutura molecular planar (HAYATSU 1992). Um estudo utilizando a hematina (cloreto de ferroporfirina que contém ferro trivalente) como modulador, revelou uma inibição parcial da atividade mutagênica do Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[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).

O Blue rayon, similarmente ao Blue Cotton, é um conjunto de fibras inertes de raio ligadas covalentemente ao mesmo pigmento, ftalocianina de cobre tiosulfato, contendo 2-3 vezes mais ligantes (aproximadamente 30 $\mu\text{mol/g}$ peso seco) que o Blue cotton (10 $\mu\text{mol/g}$ peso seco) (SAKAMOTO e HAYATSU 1990; SKOG 2004).

Com o objetivo de obter um adsorvente com mais moléculas de ftalocianina de cobre tiosulfato e, portanto, maior número de sítios de ligação para os contaminantes ambientais, foi desenvolvida a Blue chitin. A quitina em pó é capaz de conter aproximadamente 40 $\mu\text{mol/g}$ peso seco do pigmento. Normalmente a Blue chitin é utilizada em pequenas colunas para extração em fase sólida (HAYATSU e col. 1996).

O mecanismo pelo qual o Blue cotton, Blue rayon e a Blue chitin adsorvem os compostos policíclicos está diretamente relacionado com a característica planar deste tipo de molécula (HAYATSU 1992). Uma ligação hidrofóbica 1:1 é formada com o pigmento ftalocianina de cobre tiosulfato que tem uma grande estrutura molecular planar (SKOG 2004). Preferencialmente são adsorvidos pelo Blue rayon os compostos com três ou mais anéis fundidos em sua molécula. Hayatsu (1992), em um estudo de recuperação onde 62 compostos com um, dois, três ou mais anéis e alifáticos, solubilizados em salina, foram avaliados. Os compostos policíclicos

apresentaram em sua quase totalidade recuperações muito boas (acima de 75%) e os compostos com um e dois anéis apenas baixa ou moderada recuperação. Os compostos alifáticos praticamente não são recuperados por este tipo de adsorvente (HAYATSU 1992).

Desde a metade da década de 1980 o Blue Cotton, Blue rayon e a Blue chitin têm sido utilizados como técnica de extração/concentração de amostras especialmente quando a investigação de atividade mutagênica onde se suspeita do envolvimento de compostos policíclicos (HEWITT e MARVIN 2005). Sakamoto e Hayatsu (1990), descreveram a utilização do Blue rayon *in situ* e esta técnica tem sido utilizada em ambientes costeiros para recuperar das águas compostos policíclicos como os HPA, bem como avaliar atividade genotóxica (KIRA e col. 1994; KIRA e col. 1995).

O Blue rayon pode ser utilizado *in situ*, em colunas ou em frascos e têm se mostrado eficiente na extração de importantes classes de contaminantes ambientais como por exemplo os HPA, aminas aromáticas e fenilbenzotriazóis (PBTAs). O uso do Blue rayon e sua aplicação *in situ* para a extração/concentração de compostos policíclicos presentes em ambientes aquáticos estão apresentados na forma de um artigo de revisão intitulado **“USO DO BLUE RAYON PARA A EXTRAÇÃO/CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS POLICÍCLICOS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS”** (Anexo 2).

2. OBJETIVO:

Este trabalho teve como objetivos padronizar e otimizar a técnica de Blue rayon *in situ* associada ao teste de Salmonella/microsossoma em microssuspensão e análises químicas para ser utilizada como ferramenta no monitoramento da qualidade das águas do estuário de Santos quanto a presença de compostos genotóxicos e Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1 Aparelhagem

- Agitador do tipo *vortex* (FISHER SCIENTIFIC - mod. 232)
- Autoclave horizontal (BAUMER)
- Balança analítica (METTLER TOLEDO mod-AT201)
- Balança semi-analítica (METTLER TOLEDO mod-PB3002-S)
- Banho-maria (FANEM mod. 100)
- Banho seco (SYBRON/THERMOLINE mod 16525)
- Capela de segurança biológica (câmara de fluxo laminar vertical) (TROX TECHNIK - classe 2B)
- Capela de segurança química (COMTEC ENGENHARIA de LABORATÓRIO)
- Centrífuga com refrigeração (BECKMAN mod. J2-HS)
- Contador automático de colônias (ACCUCOUNT 1000 - BIOLOGICS)
- Cromatógrafo à gás equipado com detector de ionização de chama (DIC) (Shimadzu modelo GC-17)
- Cromatógrafo à gás (Shimadzu modelo GC-17A) acoplado a um espectrômetro de massa modelo QP 5050A
- Embarcação a motor para 5 pessoas
- 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)

3.1.2 Vidraria

- Ampolas de Kuderna
- Bastões de vidro
- Balões de evaporação
- Beckers
- Buretas de vidro de 10/350mm com torneiras de teflon
- Erlenmeyers
- Frascos para preparo de meio de cultura
- Frascos para soluções
- Pipetas graduadas
- Provetas graduadas com tampa de teflon
- Provetas graduadas sem tampa
- Tubos de ensaio com tampa de teflon
- Tubos de ensaio de vidro descartáveis
- *Vials* para cromatografia

3.1.3. Outros materiais

- Alças de inoculação
- Alumina (J.T. Backer)
- Bico de Bunsen
- Blue rayon (Sigma Aldrich)
- Bóias de Isopor
- Cabos de nylon
- Caixas de Isopor

- Colete salva-vidas
- Coluna para cromatografia em fase gasosa DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m)
- Coluna para cromatografia em fase gasosa DB 1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m)
- Estantes para tubos de ensaio
- Frascos Eppendorf (0,5 e 1 mL)
- Fitas adesivas
- Gás nitrogênio ultrapuro
- Lâmpadas amarelas
- Lâmpada germicida (UV)
- Luvas de procedimentos de latex
- Máscara de proteção respiratória contra gases
- Micropipetadores
- Óculos de proteção
- Papel de filtro
- Papel alumínio
- Parafilme
- Pera de sucção
- Pinças
- Pipetas plásticas descartáveis
- Placas de Petri descartáveis
- Ponteiras descartáveis
- Porta-pipetas de aço inoxidável
- Protetor facial
- Redes de nylon
- Sílica gel (MERCK)
- Tesouras

3.1.4 Reagentes

- Acetato de etila P.A. (CARLO ERBA)
- Ácido nítrico (HNO₃) P.A. (MERCK)
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄) P.A. (MERCK)

- Álcool etílico comercial
- 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 - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (CARLO ERBA) 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 (CARLO ERBA) P.A.
- Fosfato de sódio e amônio - $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (FLUKA) 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)
- Hexano P.A. (BURDICK & JACKSON)
- Hidróxido de sódio - NaOH (VETEC) P.A.
- Hidróxido de amônio (MERCK) P.A.
- Kanamicina ultra pura (INLAB)
- L-histidina HCl (SIGMA)
- Metanol P.A. (MERCK)
- 4-Nitroquinolina-1-óxido (4NQO) (SIGMA)
- 4-Nitro-o- diamino-fenilina (4NOP) (ICN Biomedicals Ind.)
- Sulfato de kanamicina (INLAB)
- Sulfato de magnésio - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (CARLO ERBA.) P.A.

3.1.5 Meios de cultura e soluções

- Meio de Vogel Bonner:

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

- Solução de glicose 10%:

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

- Solução de ágar:

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

- Solução de biotina e histidina 0,5mM

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

- Ágar mínimo:

Este meio de cultura é composto por 200 mL de solução de glicose 10%, 780 mL de solução de ágar, 50 mL de meio Vogel Bonner (50 x).

Caldo nutriente:

25 g do caldo nutriente são dissolvidos em 1 L de água destilada. Volumes de 20 mL são distribuídos em frasco com tampa de rosca, e submetidos à esterilização em autoclave.

- Ágar de superfície (Top Agar)

6 g de Bacto ágar e 5 g 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 e 12 mL de solução de biotina e histidina 0,5 mM.

- Ágar Nutriente:

Este meio de cultura é composto de 25 g de caldo nutriente, 15 g de ágar e 1 L de água destilada quente.

- Solução de biotina 0,5 mM

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

- Solução de histidina 0,5%

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

- Solução de ampicilina:

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

- Solução de Kanamicina:

0,08 g de Kanamicina são dissolvidos em 10 mL de água ultra pura. A esterilização desta solução deve ser feita por membrana filtrante de 0,22 μm (MILLIPORE) e armazenada em refrigerador em frasco escuro.

- Mistura S9 - 4% v/v

Cada 100 mL de mistura S9 é composto por: 4 mL de fração S9, 1 mL de solução cloreto de potássio (KCl) 0,4 M, 1 mL de solução cloreto de magnésio (MgCl_2) 1,65 M, 0,5 mL solução de glicose-6-fosfato 1M, 50mL de tampão fosfato 0,2 M 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

Preparada a partir de microsomas de células de fígado de rato, tratado com o indutor enzimático AROCLOR 1254 e separada por centrifugação a 9000 g. Adquirida liofilizada e armazenada a -20°C .

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

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

Solução de glicose-6-fosfato 1 M:

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

Solução de NADP 0,1 M:

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

- Tampão fosfato 0,2 M:

Solução A

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

Solução B

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

81 mL da solução A e 19 mL 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.

- Ágar mínimo para preparo de placas master:
Proceder conforme o preparo do Ágar Mínimo.

Quadro 1: Substâncias adicionadas aos meios de cultura.

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

3.1.6 Esterilização e teste de esterilidade

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

O teste de esterilidade foi realizado colocando os meios de cultura em estufa a 37 °C por pelo menos 12 horas, sendo descartadas as placas que apresentassem qualquer tipo de crescimento.

3.1.7 Lavagem de vidraria

Todos os materiais utilizados foram descontaminados em autoclave a 121 °C por 30 minutos e aqueles que eram reutilizados lavados com detergente neutro, enxaguados várias vezes e mantidos em solução de ácido sulfúrico/ ácido nítrico 30% (6:1) por 8 horas. Após esse período, o material era enxaguado 8 a 10 vezes com água corrente e posteriormente lavado uma vez com água ultrapura. Os materiais de vidro de volume não preciso eram secos em estufa a 170-180 °C.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Pontos de amostragem

Foram selecionados inicialmente dois pontos de amostragem no estuário de Santos sendo o ponto 1 (coordenadas geográficas S 23°52'22.9" ; W 46°22'44.2") equivalente ao ponto 5 do Relatório Técnico - Sistema Estuarino de Santos e São Vicente (CETESB 2001; ROUBICEK 2003) e o ponto 2 (coordenadas geográficas S 23°54'17.1" ; W 46°20'09.1") ao ponto 6 do relatório da CETESB (2001). Ambos estão sobre influência direta do regime de maré e recebem a drenagem dos municípios de Cubatão, Santos e Guarujá. A água é salobra nestes pontos. O ponto 1 recebe diretamente o despejo dos efluentes industriais de uma siderúrgica (COSIPA) bem como de esgoto domésticos e o ponto 2 recebe principalmente esgoto doméstico. Ambos estão sob influência de atividades portuárias tais como dragagem e navegação (CETESB, 2001). Posteriormente foi incluído o terceiro ponto de coleta (Figura 2) localizado em região menos impactada do estuário, o Rio Queiroz (ponto 12 do relatório CETESB de 2001), onde as fontes de contaminação são difusas e aparentemente o fluxo de pequenas embarcações e esgoto doméstico podem ser considerados como as principais fontes neste local. Neste ponto a água é doce e com menor influência das marés.

Figura 2: Pontos de amostragem localizados no estuário de Santos.

3.2.2 Procedimento de amostragem

As amostragens foram realizadas através da técnica de Blue rayon *in situ* (SAKAMOTO e HAYATSU 1990; KIRA e col. 1995). Nesta técnica as fibras de Blue rayon, previamente lavadas e apresentando resultados negativos para o teste de Salmonella/microsoma em microssuspensão (KUMMROW e col. 2003), são acondicionadas em redes de nylon (Figura 3) que são conectadas a uma poita (5 kg) e a uma bóia através de um cabo de nylon. Os conjuntos são colocados nos pontos de amostragem e as fibras permanecem imersas por 24 h.

Utilizando-se embarcação adequada, em cada ponto de amostragem foram colocados de 10 a 20 g de Blue rayon divididos em redes contendo 5 g cada conectadas a 40 cm da poita no cabo de ligação com a bóia (Figura 4). Após o período de 24 horas o conjunto é removido e as fibras de Blue rayon levadas ao laboratório, em frasco coberto e ao abrigo da luz e transportados em caixas de isopor, para realização dos procedimentos de preparo dos extratos.

Figura 3: Rede de nylon contendo 5 g de Blue rayon.

Figura 4: Conjunto para amostragem (Blue rayon *in situ*) pronto para ser utilizado no estuário.

3.2.3 Preparo dos extratos orgânicos

Todos os procedimentos de envolvidos no preparo dos extratos foram realizados sob luz amarela para evitar reações fotoquímicas desencadeadas pela incidência de radiação UV emitida por lâmpadas brancas.

O preparo dos extratos é composto por duas etapas sendo a primeira a limpeza das fibras e segunda a eluição destas.

A lavagem das fibras é realizada em bequer limpo com água ultrapura e agitação com bastão de vidro até que a água de lavagem permaneça límpida. O excesso de água é retirado das fibras com papel filtro e estas são transferidas para erlenmeyers previamente lavados com a solução de eluição.

Para eluição é utilizada uma solução de metanol/hidróxido de amônio (50:1 v/v) (HAYATSU 1992) na proporção de 200 mL/g de Blue rayon, e submetidos a agitação mecânica em agitador rotatório à aproximadamente 150 rpm. Devem ser realizados 5 ciclos de agitação, de uma hora cada, com volumes da solução de eluição adequados a quantidade de Blue rayon, respeitando a proporção citada.

Os extratos obtidos em todos os ciclos de agitação devem ser misturados e levados a secagem completa em evaporador rotatório com banho de aquecimento a 45 °C sob vácuo. O resíduo obtido após a completa evaporação da solução de eluição deve ser ressuspensionado em metanol puro e transferido para ampolas de Kuderna.

Para os testes de mutagenicidade através do ensaio de Salmonella/microsossoma em microssuspensão alíquotas dos extratos equivalentes a 6g de Blue rayon devem ser transferidas para tubos de ensaio com tampa de teflon e lavados ao fluxo leve de nitrogênio para a completa secagem e mantidos ao abrigo da luz até o momento das análises.

Com o extrato restante foram realizados seu fracionamento em colunas de sílica/alumina, sendo as frações submetidas também ao ensaio de Salmonella/microsossoma e a análises químicas.

3.2.4 Fracionamento dos extratos

O fracionamento dos extratos obtidos através da técnica de Blue rayon *in situ* foi realizado em colunas de sílica gel/alumina como descrito por GRIFOLL e col. 1990, obtendo-se seis frações. Para tanto, volumes de extrato equivalentes a 4 ou 10 g de Blue rayon são ressuspensionados em 2 mL de hexano e incorporados a 1 g de alumina. Os extratos incorporados a alumina são levados a completa secagem sob fluxo leve de nitrogênio.

A amostra seca e incorporada à alumina é depositada sobre as colunas de fracionamento previamente preparadas com 8 g de sílica gel na porção inferior e 7 g

de alumina na porção superior, lavadas com 30 mL de hexano, 30 mL DCM, 30 mL de metanol e 30 mL de éter etílico. Foram utilizadas como suporte para a sílica gel/alumina buretas de vidro de 10/350 mm com torneiras de teflon.

Através deste procedimento os extratos foram divididos em seis frações de polaridade crescente sendo a primeira obtida pela adição de 20 mL de hexano, a segunda por 20 mL da solução de 10% de DCM em hexano, a terceira por 40 mL da solução de 20% de DCM em hexano, a quarta por 20 mL da solução de 75% de DCM em hexano, a quinta por 40 mL da solução de 5% de metanol em DCM e a sexta por 40 mL de éter etílico. É importante que após o início do procedimento, este não seja interrompido pois as colunas de fracionamento não podem secar durante a passagem do extrato.

Estas frações foram coletadas em provetas com tampa de teflon e levadas a completa secagem sob fluxo de nitrogênio até volumes de aproximadamente 3 mL sendo transferidos para tubos de ensaio com tampa de teflon e conservadas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz até o momento das análises.

3.2.5 Ensaio de Salmonella/microsossoma em microssuspensão

Este ensaio emprega linhagens de *Salmonella typhimurium* derivadas da linhagem parental LT2, auxotróficas para histina (*his*⁻), especialmente desenvolvidas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de bases do DNA. Essas linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem a capacidade de síntese desse aminoácido (MARON e AMES 1983).

O ensaio consiste em expor estas linhagens de *Salmonella* à amostra a ser avaliada em placas de ágar mínimo suplementados com biotina e quantidade limitada de histidina e biotina, na presença e na ausência de um sistema de metabolização *in vitro* (mistura S9). A mistura S9 consiste de homogenato de células de fígado de rato tratado com AROCLOR 1254, empregado para a indução de enzimas do sistema citocromo P450, acrescida de cofatores (KRANENDONK e col., 2000; MAILLING 1971). Para este estudo a mistura S9 foi preparada de acordo com MARON e AMES (1983), à 4% v/v e cofatores. Após 66 horas de incubação as placas são contadas em contador automático de colônias.

A presença de mutágenos na amostra é avaliada pela comparação do número de colônias das placas teste (revertentes espontâneos e induzidos) em relação ao número de colônias das placas de controle negativo (revertentes espontâneos) como ilustrado na Figura 5.

Figura 5: Placas de ágar mínimo com colônias *his*⁺ de *Salmonella typhimurium* (linhagem TA98). Placa à esquerda: revertentes espontâneos. Placa à direita: revertentes espontâneos e induzidos.

Além da mutação em vários pontos do operon responsável pela biossíntese da histidina, as linhagens desenvolvidas para este teste apresentam características genéticas que permitem melhor detecção de variados tipos de mutágenos. A mutação *rfa* causa perda parcial da barreira de polissacarídeos da parede bacteriana, permitindo a penetração de moléculas grandes na célula. A deleção de um dos genes do sistema de reparo por excisão, *uvrB*, e a presença do plasmídeo pKM101, marcado com o gene de resistência à ampicilina e contendo o gene *muc*, envolvido no sistema de reparo passível de erro (SOS), tornando as linhagens mais sensíveis as mutações.

Embora apenas este teste não seja capaz identificar os contaminantes, a mutagenicidade total é um indicador de atividade genotóxica presente em amostras

ambientais. Além disso, a resposta obtida com linhagens de *Salmonella* sensíveis a diferentes grupos químicos, pode auxiliar na identificação da classe de compostos genotóxicos presentes nas amostras (UMBUZEIRO e col. 2004b).

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, além das linhagens desenvolvidas para detecção de nitro-compostos YG1041 e YG1042, que possuem plasmídios pYG233 marcado com o gene de resistência a Kanamicina e com os genes da nitrorredutase e O-acetiltransferase, intensificando a metabolização desses compostos e elevando a resposta mutagênica em relação às linhagens parentais TA98 e TA100 respectivamente (HAGIWARA e col. 1993; MARON e AMES 1983; UMBUZEIRO e col. 2005). O DMSO foi utilizado como solvente para todos os extratos e suas frações bem como controle negativo para todas as linhagens. Na Tabela 1 estão apresentados os genótipos e os tipos de mutações preferencialmente detectados pelas linhagens de *Salmonella* e seus respectivos controles positivos empregados neste estudo.

Tabela 1: Genótipo, tipo de mutação preferencialmente detectada e controles positivos das linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas neste estudo.

Linhagem de <i>Salmonella</i>	Genótipo	Tipo de mutação detectada no DNA	Referência	Controles positivos	
				- S9	+ S9
TA98	<i>HisD3052, rfa, Δbio, ΔuvrB, pKM101</i>	Deslocamento no quadro de leitura	MARON e AMES (1983)	4-NQO (0,125 μg/placa)	2AA (0,625 μg/placa)
TA100	<i>HisG46, rfa, Δbio, ΔuvrB, pKM101</i>	Troca de par de bases	MARON e AMES (1983)	4-NQO (0,125 μg/placa)	2AA (0,625 μg/placa)
YG1041	<i>HisD3052, rfa, Δbio, ΔuvrB, pKM101, pYG 233 (produção aumentada das enzimas acetiltransferase e nitroredutase)</i>	Deslocamento no quadro de leitura	HAGIWARA e col. (1993)	4-NOP (5μg/placa)	2AA (0,03125 μg/placa)
YG1042	<i>HisG46, rfa, Δbio, ΔuvrB, pKM101, pYG 233 (produção aumentada das enzimas acetiltransferase e nitroredutase)</i>	Troca de par de bases	HAGIWARA e col. (1993)	2-NF (2,5 μg/placa)	2AA (0,625 μg/placa)

4-NQO - 4-nitroquinolina-1-óxido

2-AA - 2-aminoantraceno

4-NOP - 4-nitro-o-diamino-fenilina

2-NF - 2nitrofluoreno

As linhagens utilizadas neste estudo foram sistematicamente testadas quanto à presença destas características, através do procedimento denominado preparo de placas mãe.

3.2.5.1 Preparo da placa-mãe

As linhagens de *Salmonella typhimurium* foram armazenadas permanentemente em freezer a - 70 °C, em ampolas com 0,9 mL de cultura e 0,1 mL 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 linhagem foram previamente avaliadas como descrito abaixo.

Uma alíquota de cultura permanente foi inoculada em 20 mL 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 5 mL de caldo nutriente, uma a uma.

Estas são incubação sob agitação a 37 °C e após este período 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 5 mL de caldo nutriente foi também inoculada através de zaragatoa esterilizados, em placas de ágar nutriente para verificação da presença da mutação *rfa*, do plasmídeo pKM101 e da deleção de *uvrB*.

Mutação rfa

Colocou-se discos de papel de filtro de 5mm de diâmetro embebido com 10 µL 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 14 mm ao redor do disco.

Plasmídio pKM101

Com auxílio de uma alça de inoculação foram aplicadas cinco linhas de solução de ampicilina 20 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.

Plasmídio pYG233

O procedimento é mesmo descrito para o plasmídio pKM101, porém com utilização de solução de 20 mg/mL de sulfato de kanamicina como antibiótico.

Deleção uvrB

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

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

3.2.5.2 Taxa de reversão espontânea

A taxa de reversão espontânea foi avaliada inoculando-se 100 µL de cada cultura em 2,5 mL 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 linhagem.

Das 5 culturas analisadas de cada linhagem foram escolhidas duas com características genéticas adequadas, e delas, foram preparadas culturas permanentes. As placas-mãe correspondentes foram usadas como inóculo durante os ensaios, pelo período de 2 meses.

3.2.5.3 Procedimento do ensaio

A avaliação da atividade mutagênica dos extratos totais (em todas as campanhas) e suas frações (nas duas campanhas iniciais) foi feita utilizando o protocolo desenvolvido por KADO e col. 1983, denominado Salmonella/Microsossoma em microssuspensão.

3.2.3.5.1 Protocolo de microssuspensão

As culturas das linhagens foram inoculadas com alça de platina em 20 mL 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.

Os extratos obtidos de acordo com o item 3.2.2 foram ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO) em diferentes diluições. Volumes de 5 µL de cada diluição foram adicionados a um tubo de ensaio contendo 50 µL de suspensão da linhagem (2×10^9 células), concentrada 5 vezes e 50 µL da mistura S9. Nos testes realizados na ausência de ativação metabólica são colocados 50 µL de tampão fosfato 0,2 M diluído 1:13. Essa solução foi homogeneizada e incubada a 37 °C ($\pm 0,5$) por 90 minutos, em agitação. Após esse tempo, foram adicionados 2 mL de ágar de superfície (acrescido de biotina/histidina), vertendo-se em placa de petri contendo 20 mL de ágar mínimo. As placas foram incubadas invertidas, por 66 horas em temperatura de 37 °C ($\pm 0,5$). O esquema abaixo ilustra o procedimento do teste.

A quantificação do número de revertentes é feita pela contagem do número de colônias que cresceram em meio mínimo após 66 horas de incubação. O número de revertentes por placa foi avaliado utilizando-se um contador automático de colônias AccuCount 1000, BioLogics.

Esquema 1: Esquema do teste de Salmonella/microsoma em microssuspensão

3.2.5.4 Interpretação de resultados e análises estatísticas

Os resultados das duas primeiras campanhas deste trabalho foram avaliados apenas por suas razões de mutagenicidade (RM), que é a razão entre os revertentes espontâneos mais os revertentes induzidos por compostos genotóxicos, quando presentes nas amostras (resultados positivos) e os revertentes espontâneo (resultado do controle negativo) pois, foram realizados ensaios com uma única dose para a avaliação preliminar da mutagenicidade.

Nas demais campanhas, onde os ensaios foram realizados em dose-resposta os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente. 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, no qual 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.

A análise de variância (ANOVA) é aplicada para verificação de diferenças estatísticas entre o controle negativo e as doses utilizadas, seguida de regressão linear. A potência da amostra é expressa pela inclinação da parte linear da curva dose-resposta. 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 comprovada estatisticamente indicam atividade genotóxica da amostra.

Os critérios de positividade adotados neste trabalho foram, para as duas primeiras campanhas foi valores de RM maior ou igual a 2 a amostras é considerada positiva, RM maior que 1,5 e menor que 2 presença de indícios de mutagenicidade e RM menor que 0,7 presença de toxicidade.

Nas demais campanhas deste trabalho, quando a ANOVA e a dose resposta foram significativas e o RM maior ou igual a 2, a amostra foi considerada positiva; em casos em que a ANOVA e a dose resposta foram significativas, porém o RM foi menor que 2, o teste era repetido, e se o resultado fosse reprodutível, o teste era considerado positivo. Caso não fosse possível repetir, o resultado era considerado como indícios de mutagenicidade. Foram considerados como resultados negativos

os casos em que a ANOVA e/ou a dose resposta não foram significativos (SBMCTA 2004).

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 e col. 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, modelo contido no próprio programa SALANAL.

3.2.6 Análises cromatográficas

As determinações analíticas por Cromatografia a gás para detecção/quantificação relativa (por grama de Blue rayon) dos HPA, bem como a identificação preliminar de compostos mutagênicos por espectrometria de massas foram realizadas em colaboração com os membros do laboratório da Dra. Lilian Carvalho do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

As frações 3 dos extratos foram submetidos a análises de identificação e quantificadas relativa (ng dos HPA por grama de Blue rayon) por cromatografia a gás (CG). Na separação foi utilizada uma coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) em um cromatógrafo Shimadzu modelo GC-17 equipado com detector de ionização de chama (DIC). Todas as injeções foram *splitless* e o volume injetado foi 1 μ L. As temperaturas do detector e injetor foram 320 °C e 300 °C respectivamente. A temperatura do forno variou de 100 °C (1 min) a 280 °C (26,5 min) com rampa de aquecimento de 8 °C min⁻¹.

A identificação dos HPA nas amostras foi feita por comparação com os tempos de retenção de uma mistura de padrões do fabricante SUPELCO. O método do padrão externo foi usado na quantificação. Foram preparadas seis soluções de concentrações diferentes de uma mistura padrão de 16 HPA. Foram obtidas 16 curvas, uma para cada componente. Na quantificação do Benzo(e)pireno foi usada mesma curva do Benzo(a)pireno. Os coeficientes de correlação (R) obtidos das curvas foram maiores que 0,9990. Os limites de detecção e de quantificação para os HPA determinados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Limites de detecção e quantificação para os HPA determinados nas frações 3 dos extratos.

HPA	LD (ng)	LQ (ng)
Benzo(a)antraceno	0,66	2,20
Criseno	0,49	1,62
Benzo(b)fluoranteno	1,12	3,75
Benzo(k)fluoranteno	0,55	1,82
Benzo(a)pireno	0,58	1,95
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,81	2,69
Dibenzo(a,h)antraceno	1,65	5,50
Benzo(ghi)perileno	1,12	3,73

Para a identificação preliminar de compostos mutagênicos mais polares presentes nas frações 5 dos extratos obtidos a técnica de CG/MS foi aplicada utilizando um Cromatógrafo a gás SHIMADZU modelo GC 17A acoplado a um espectrômetro de massa modelo QP 5050A. A coluna utilizada para estas análises foi a DB 1 de 30 m de comprimento e diâmetro de 0,25 mm sendo o gás de arraste o hélio com fluxo de 1 mL/min. As injeções foram realizadas em modo splitless; as temperaturas do injetor e do detector foram ambas de 250 °C. A programação de temperaturas do forno foi: temperatura inicial de 80 °C sendo elevada a 20 °C/min até atingir a temperatura de 160 °C permanecendo nesta temperatura por 2 min após este tempo elevada a 4 °C/min até a temperatura de 270 °C permanecendo a esta temperatura por 10,75 min sendo novamente elevada a 15 °C/min até a temperatura de 300 °C permanecendo a esta temperatura por 5,2 min.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Esse trabalho foi realizado em duas etapas sendo a primeira de padronização da técnica de Blue rayon *in situ* ancorado próximo ao fundo do corpo d'água e da escolha da linhagem de *Salmonella typhimurium* mais sensível aos compostos genotóxicos presentes nas águas do Estuário de Santos. Esses foram obtidos em duas campanhas de amostragem realizadas em locais de coleta onde o sedimento apresenta diferentes níveis de contaminação (pontos 1 e 2).

A segunda etapa constitui-se na aplicação da estratégia, definida nas campanhas de amostragem iniciais, em cinco novas campanhas realizadas em três locais de amostragem (pontos 1, 2 e 3) afim de verificar sua utilização como ferramenta para o monitoramento da qualidade das águas do estuário de Santos quanto a presença de compostos policíclicos genotóxicos. Os resultados obtidos durante a primeira e a segunda etapa do estudo estão também apresentados na forma de dois artigos científicos (anexos 3 e 4 respectivamente).

Durante a primeira etapa desse estudo a técnica de Blue rayon *in situ* foi modificada. Na técnica original de Blue rayon *in situ*, descrita por Sakamoto e Hayatsu (1990), as redes contendo as fibras de Blue rayon são fixadas na bóia, permanecendo próximas a superfície do corpo d'água. Nesse trabalho as redes contendo as fibras foram fixadas a 40 cm da poita com o objetivo de mantê-las a uma distância padronizada dos sedimentos. Como esses sedimentos são sabidamente contaminados por HPA (CETESB 2001) e apresentam atividade mutagênica (ROUBICEK 2003), quando ressuspensos podem ser uma importante fonte desses contaminantes para a coluna d'água.

Os resultados obtidos na primeira etapa do trabalho para o teste Salmonella/microsossoma em microssuspensão realizados em dose única nos extratos totais e frações estão apresentados na tabela 3. Apesar de tratar-se de uma avaliação preliminar da atividade mutagênica pois os extratos e suas frações foram testados em apenas uma dose, foi possível verificar que o ponto 1, o qual contém os sedimentos mais contaminados do estuário e está sujeito à influência direta de efluentes da siderúrgica (CETESB 2001), apresentou maior freqüência de resultados positivos e valores de RM maiores que o ponto 2, nas duas campanhas de amostragem. O ponto 2 apresentou resultados positivos apenas para a linhagem YG1041 na presença de S9 nos extratos totais das duas campanhas de amostragem e na fração 5 do extrato da segunda campanha.

Entre as quatro linhagens de *Salmonella typhimurium* avaliadas (TA98, TA100, YG1041 e YG1042) nesta etapa do trabalho, a YG1041, que além de detectar HPA mutagênicos é também mais sensível para nitro compostos e aminas aromáticas, foi a que apresentou maior sensibilidade para detectar atividade mutagênica nos extratos obtidos e em suas frações para ambos os pontos estudados.

Tabela 3. Resultados obtidos no teste de Salmonella/microsossoma em microssuspensão, em razão de mutagenicidade (RM) para os pontos 1 e 2, com as linhagens TA98, YG1041, TA100 e YG1042, na presença e na ausência de ativação metabólica (mistura S9).

Frações	Campanhas	TA 98		YG 1041		TA 100		YG 1042	
		- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
Ponto 1									
Total	I	4,3*	6,2*	Tox**	7,5*	NR***	NR***	5,0*	3,8*
	II	1,8	1,9	14,5*	16,9*	1,5	1,8	2,5*	2,2*
F - 1	I	1,2	0,9	0,9	1,0	0,9	1,2	0,9	1,1
	II	0,8	0,9	Tox**	Tox**	0,8	1,0	0,9	1,1
F - 2	I	5,6*	1,9	Tox**	Tox**	3,3*	1,3	2,4*	1,6
	II	1,0	0,9	0,9	1,1	0,9	1,0	1,1	1,2
F - 3	I	10,4*	2,4*	Tox**	1,1	3,6*	3,5*	2,2*	1,5
	II	3,2*	1,3	1,2	1,2	1,5	2,3*	1,4	1,3
F - 4	I	2,9*	2,1*	2,9*	2,4*	1,3	2,4*	2,4*	1,6
	II	1,2	1,2	1,9	1,2	0,9	1,0	1,3	1,4
F - 5	I	6,9*	5,6*	2,3*	3,1*	2,6*	5,7*	3,5*	4,4*
	II	8,1*	1,7	2,0*	3,0*	1,5	1,9	2,4*	2,1*
F - 6	I	3,4*	2,0*	2,5*	2,5*	1,3	2,3*	2,3*	2,5*
	II	2,0*	1,2	1,8	2,0*	0,9	1,1	1,9	1,7
Ponto 2									
Total	I	0,9	1,4	1,4	2,6*	NR***	NR***	1,1	1,1
	II	0,7	0,7	1,3	3,3*	0,7	0,8	0,9	1,4
F - 1	I	1,3	0,9	0,7	0,9	1,0	1,2	0,9	1,1
	II	0,9	0,8	0,9	0,9	1,2	1,0	1,2	1,1
F - 2	I	1,2	1,2	0,7	1,0	1,1	1,2	1,0	1,2
	II	0,9	0,9	0,7	1,1	0,8	0,9	1,1	1,2
F - 3	I	1,2	0,9	0,9	1,2	1,1	1,5	1,1	1,1
	II	1,1	1,0	0,9	1,0	1,2	1,3	1,2	1,3
F - 4	I	0,9	1,0	0,9	0,9	1,2	1,2	0,9	1,0
	II	0,9	0,8	0,7	1,0	1,2	1,0	1,1	1,1
F - 5	I	1,4	0,8	1,1	2,8*	1,2	1,5	1,2	1,3
	II	1,0	0,9	1,2	1,8	1,1	1,2	1,2	1,4
F - 6	I	1,1	1,0	0,7	1,2	0,8	1,1	1,1	1,0
	II	1,4	1,1	1,5	1,3	1,2	1,1	1,2	1,1

*RM ≥ 2 – indica atividade mutagênica na dose testada

**Tox: tóxico, RM $< 0,7$ – indica toxicidade na dose testada

***NR - Teste não realizado

Nesta etapa foram realizadas algumas análises químicas. Nas frações número 3, obtidas por fracionamento químico em colunas de sílica gel/alumina foram determinados, por cromatografia em fase gasosa, os HPA Benzo(a)antraceno, Criseno, Benzo(b)fluranteno, Benzo(k)fluranteno, Benzo(e)pireno, Benzo(a)pireno, Indeno(1,2,3-cd)pireno, Dibenzo(a,h)antraceno e Benzo(g,h,i)pirileno (Figura 6). Esses HPA foram verificados nas frações 3 dos extratos da primeira campanha em ambos os pontos de amostragem e apenas no ponto 1 na segunda campanha. Foram observadas grandes variações nas concentrações destes compostos, tanto em relação aos pontos como entre as campanhas. Apesar da variabilidade dos dados, as águas do ponto 1 apresentaram concentrações relativamente maiores dos compostos analisados (Anexo 3).

Figura 6: Cromatograma de fração 3 de extrato de Blue rayon obtido no ponto 1.

Legenda - Tempos de retenção dos HPA (em minutos): Benzo(a)antraceno 22,492; Criseno 22,604; Benzo(b)fluranteno 25,805; Benzo(k)fluoranteno 25,888; Benzo(e)pireno 26,795; Benzo(a)pireno 26,871; Indeno(1,2,3-cd)pireno 32,552; Dibenzo(a,h)antraceno 32,781 e Benzo(g,h,i)pirileno 34,103.

Como as frações 5 também apresentaram importante atividade mutagênica em ambos os pontos de amostragem, as mesmas foram submetidas a análises químicas preliminares por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. Em ambos os pontos e nas duas campanhas foram detectados os seguintes compostos: 9H-fluoren-9-ona (CAS: 486-25-9), Antraquinona (CAS: 85-68-1), 5H-fenantro[4,5-bcd]piran-5-ona (CAS: 237-02-49-0), 7H-benzo[de]antracen-7-ona (CAS: 82-05-3), Benzo(c)acridina (CAS: 225-51-4), 9-nitroso-9H-carbazol (CAS: 2788-23-0) entre outros. Devido a falta de padrões não foi possível confirmar e quantificar os compostos detectados.

Os resultados das duas campanhas iniciais mostram que o ponto 1 que está sob influência da companhia siderúrgica COSIPA, apresentou maior frequência de resultados positivos para o ensaio *Salmonella*/microsoma em microssuspensão e maiores concentrações relativas de HPA em ambas as campanhas em comparação com o ponto 2 sabidamente menos impactado por despejos industriais. Com esses dados é possível sugerir que a técnica de Blue rayon *in situ*, com as redes fixadas a 40 cm da poita, associada ao ensaio *Salmonella*/microsoma com a linhagem YG1041 se mostrou uma estratégia adequada para ser aplicada no monitoramento da qualidade das águas do estuário de Santos quanto a presença de compostos genotóxicos e HPA.

Para avaliar essa estratégia foi executada a segunda etapa desse trabalho. Nessa etapa foram realizadas cinco campanhas de amostragem com o objetivo de se verificar a aplicabilidade da técnica no monitoramento da atividade genotóxica das águas do estuário de Santos.

A estratégia adotada para esse monitoramento foi a extração/concentração com a técnica de Blue rayon *in situ* ancorado, como já descrita anteriormente, seguida do teste de *Salmonella*/microsoma em microssuspensão com a linhagem YG1041 na presença e na ausência de mistura S9 em experimentos dose-resposta, permitindo a avaliação das potências mutagênicas. Essa estratégia foi aplicada nos dois pontos de coleta selecionados inicialmente e em um terceiro, localizado também em região menos impactada desse estuário e com menos influência da cunha salina. Os resultados estão apresentados de forma resumida na figura 7 e no Anexo 4 na forma de um artigo científico.

Como no estudo inicial, o ponto 1, sob influência dos despejos da COSIPA, apresentou as maiores potências mutagênicas, principalmente na presença de

ativação metabólica (mistura S9), com valor máximo de 36.000 revertentes/g de Blue rayon. Os resultados apresentaram grande variação entre as campanhas indicando a importância de uma série de amostragens para a caracterização da mutagenicidade dos locais mais impactados do estuário. Os pontos 2 e 3 apresentaram atividades mutagênicas similares entre si com potências em torno de 1.000 revertentes/g de Blue rayon, com menos variação entre as campanhas.

Com base nos resultados dos pontos 2 e 3 que são menos impactados e não estão sob influência direta do despejo de efluentes industriais podemos sugerir que a presença de atividade mutagênica com potências de até 1000 revertentes/g de Blue rayon pode ser considerada como um valor basal para esta região, quando utilizada a linhagem YG1041, e que potências acima deste valor indicaram a necessidade da tomada de alguma ação para mitigação ou ações de controle. Mais análises utilizando a mesma estratégia, em locais menos impactados estão em andamento para confirmação do valor basal da região.

Os resultados dos testes de mutagenicidade realizados indicam que as águas do estuário de Santos estão contaminadas por outros compostos além dos HPA não substituídos. Devido a maior sensibilidade da linhagem YG1041 para nitro compostos e aminas aromáticas podemos sugerir que estas classes possam responsáveis por grande parte da atividade mutagênica observada, principalmente na ausência de ativação metabólica que não poderia ser atribuída aos HPA, do tipo Benzo(a)pireno entre outros, pois os mesmos necessitam de ativação metabólica para exercer sua atividade mutagênica (Ver tabela 2 do Anexo 4). Análises químicas adicionais para identificação de compostos mutagênicos, especialmente das classes nitro compostos e aminas aromáticas, deveriam ser realizadas para a identificação dos mutágenos mais relevantes presentes nas águas do estuário de Santos.

Figura 7: Potências mutagênicas (nº de revertentes/g de Blue rayon) dos extratos obtidos nas cinco campanhas de amostragem nos três pontos de coleta estudados no estuário de Santos para o teste de Salmonella/microsossoma em microssuspensão com a linhagem YG1041 na ausência e presença de mistura S9.

NR: Não realizado

ND: Atividade genotóxica Não Detectada

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES:

A técnica de Blue rayon *in situ* ancorado, com as redes fixas a uma distância padronizada do sedimentos, associada ao teste de Salmonella/microsossoma em microssuspensão com a linhagem YG1041 na presença e na ausência de mistura S9 mostrou-se uma alternativa eficiente e aplicável para o monitoramento de águas estuarinas, principalmente em regiões onde possa haver ressuspensão de sedimentos contaminados ou outros episódios agudos de poluição.

A mutagenicidade detectada no ponto 1 foi a mais elevada entre os três pontos avaliados com valores máximos de 5.100 e 36.000 revertentes/g de Blue rayon na ausência e na presença de ativação metabólica, e parece estar relacionada com a ressuspensão do sedimento, sabidamente contaminado com HPA. Os pontos 2 e 3 apresentaram atividade mutagênica muito similares entre si com valores em torno de 1.000 revertentes/g de Blue rayon e que parece ser o valor basal para essa região quando utilizada a linhagem YG1041.

Recomendamos que campanhas de amostragens sejam realizadas durante procedimentos de dragagem ou outras atividades onde a ressuspensão do sedimento possa ocorrer, ou ainda durante episódios agudos de poluição para confirmar a aplicabilidade desta técnica no monitoramento da qualidade das águas da região.

O perfil dos resultados do teste de Salmonella/microsossoma com a linhagem YG1041, na ausência e na presença de ativação metabólica, observados para os extratos obtidos com o Blue rayon sugerem que as águas do estuário de Santos contém outros compostos mutagênicos além dos HPA não substituídos, possivelmente da classe dos nitrocompostos e amins aromáticas. Sugere-se a realização de análises químicas para identificação dos mutágenos presentes nessas águas.

6. REFERÊNCIAS:

- ALMEIDA F.V. **Bases Técnico-Científicas para o Desenvolvimento de Critérios de Qualidade de Sedimentos Referentes a Compostos Orgânicos Persistentes**. Campinas, 2003. p. 114. Tese de Doutorado - Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas.
- BARRETO J.C.N. **Caracterização de toxicidade de efluentes de usina siderúrgica mediante bioensaios com microorganismos**. São Paulo, 1995. p. 71. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo.
- 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.
- BRUSICK D.J.; GOPALAN H.N.B.; HELSTINE E.; HUISMANS J.W.; LOHMAN P.H.M. (ESD) **Assessing the risk of genetic damage**. HODDER & STOUGHTON, Nairobi, 1992.
- CAO Z.; WANG Y.; MA Y.; XU Z.; SHI G.; ZHUANG Y.; ZHU T. Occurrence and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in reclaimed water and surface water of Tianjin, China. **J. Hazard. Mater.**, Amsterdam, v. A122, p.51-59, 2005.
- CETESB. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório Técnico Sistema Estuarino Santos São Vicente – Agosto de 2001**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/relatorio.asp>. Acesso em: Junho de 2005.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Relatório Técnico: Metais pesados na Baía de Santos e Estuários de Santos e São Vicente**. São Paulo.1981; 1: 231p.

- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Relatório Técnico: Avaliação da toxicidade das águas, sedimentos dos rios e efluentes industriais da região de Cubatão.** 1986; 1-2: 212p.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Relatório Técnico: Contaminantes na Bacia do rio Cubatão e seus Reflexos na Biota Aquática.** 1990; 1: 228p.
- CHEN G.; WITHE P. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 567, p.151-225, 2004.
- COELHO M.C.L.S. **Mutagênicidade 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 – Universidade de São Paulo.
- COUNTWAY R.E.; DICKHUT R.M.; CANUEL E.A. Polycyclic aromatic Hydrocarbons (PAH) distributions and associations with organic matter in surface water of the York River, VA Estuary. **Org. Geochem.**, Oxford, v. 34, p. 209-224, 2003.
- DABASTANI R.; IVANOV I.N. A compilation of physical and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v. 70, n.1, p. 10-34, 1999.
- DEARFIELD K.L.; CIMINO M.C.; McCARROLL N.E.; MAUER I.; VALCOVIC L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy¹. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 521, p.121-135, 2002.
- DONNELLY K.C.; HUEBNER H.J.; CLAXTON L.D.; CALVIN J.A.; VOS G.A.; CIZMAS L.; HE L. Biodegradation of simple chemical mixtures in soil. **Environ. Toxicol. Chem.**, Houston, v. 24(11), p. 2839- 2845, 2005.

- FARIA M.A.M.; ALMEIDA J.W.R.; ZANETA D.M.T. Gastric and colorectal cancer mortality in na urban and industrialized area of Brazil. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 198-205, 2001.
- FARIA M.A.M.; ALMEIDA J.W.R.; ZANETA D.M.T. Mortalidade por câncer na região urbano-industrial da Baixada Santista, SP (Brasil). **Rev Saúde Pública**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 255-261, 1999.
- FERNANDES M.B.; SICRE M.A.; BOIREAU A.; TRONCZYNSKI J. Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distribution in the Seine River and its estuary. **Mar. Pollut. Bull.**, London, v. 34, n. 11, p. 857-867, 1997.
- FERRER I.; BARCELÓ D. Validation of new solid-phase extraction materials for the selective enrichment of organic contaminants from environmental samples. **Trends Analyt. Chem.**, Amsterdam, v. 18, n. 3, p. 180-192, 1999.
- GRIFOLL M.; SOLANAS A.M.; BAYONA J.M. Characterization of genotoxic compounds in the sediment by mass spectrometric technics combined with Salmonella/microsome test. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, Oxford, v. 19, p. 175-184, 1990.
- GUZZELLA L.; ROSCIOLI C.; VIGANO L.; SAHA M.; SARKAR S.K., BHATTACHARYA A. Evaluation of the concentration of HCH, DDT, HCB, PCB and PAH in the sediments along the lower stretch of Hugli estuary, West Bengal, northeast India. **Environ. Int.**, Oxford, v. 31, p. 523-5344, 2005.
- HAGIWARA Y.; WATANABE M.; ODA Y.; SOFUNI T.; NOHMI T. Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 291, p. 171-180,1993.

- HAYATSU H.; OKA T., WAKATA A.; OHARA Y.; HAYATSU T.; KOBAYASHI H.; ARIMOTO S. Adsorption of mutagens to cotton bearing covalently bound trisulfo-copper-phtalocyanine. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 119, p. 233-238, 1983.
- HAYATSU H. Cellulose bearing covalently linked copper phtalocyanine 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., 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.
- HELLOU J.; STELLER S.; LEONARD J.; LANGILLE M.A.; TREMBLAY D. Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons between water and particles compared to bioaccumulation in mussels: a harbour case. **Mar. Environ. Res.**, London, v. 59, p. 101-117, 2005.
- HEWITT L.M.; MARVIN C.H. Analytical methods in environmental effects-directed investigation of effluents. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.589, p.208-232, 2005.
- HOUK V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.277, p.91-138, 1992.
- HU C.; CHEN Z.; CLAYTON T.D.; SWARZENSKI P.; BROCK J.C.; MULLER-KARGER F.E. Assessment of estuarine water-quality indicators using MODIS medium-resolution bands: Initial results from Tampa Bay, FL. **Remote Sensing of Environment**, St. Paul, v. 93, p. 423-441, 2004.
- HYLLAND K. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. **J. Toxicol. Environ. Health**, London. v.69, p. 109-123, 2006.

- 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.
- KIRA S.; ITO T.; HAYATSU H.; TAKETAK.; ZHENG Y.; LI R.; HOLLIDAY T.L.; GIAM C.S. Detection of waterborne mutagens and characterization of chemicals in selected Galveston sites after an oil spil. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 53, p. 285-291, 1994.
- KIRA S.; TAKETA K.; NOGAMI Y.; HAYATSU H. A simple technique 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.
- KLEINJANS J.C.S.; VanSHOOTEN F.J. Ecogenotoxicology: the evolving field. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, Amsterdam, v.11, p.173-179, 2002.
- KRANENDONK M.; LAIRES A.; RUEFF J.; ESTABROOK R.W.; VERMEULEN N.P.E. Heterologous expression of xenobiotic mammalian-metabolizing enzymes in mutagenicity tester bacteria: an update and practical considerations. **Crit. Rev. Toxicol.**, Cleveland, v. 30, p. 287-306, 2000.
- KUCKLICK J.R.; SILVERTSEN S.K.; SANDES M.; SCOTT G.I. Factors influencing polycyclic aromatic hydrocarbon distributions in South Carolina estuarine sediments. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, Amsterdam, v. 213, p. 13-29, 1997.
- KUMMROW F.; RECH C.M.; COIMBRÃO C.A; ROUBICEK D.A.; UMBUZEIRO G.A. Comparision of the mutagenic activity of XAD4 and the blue rayon extracts of surface water and related drinking water samples. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 541, p.103-113, 2003.

- LOU X.; MAI B.; YANG Q.; FU J.; SHENG G.; WANG Z. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) and organochlorine pesticides in water columns from the Pearl River and Macao Harbor in the Pearl River Delta in South China. **Mar. Pollut. Bull.**, London, v. 48, p. 1102-1115, 2004.
- MAILLING H.V. Dimethylnitrosamine: formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsome. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 12, p. 425-429, 1971.
- MARON D.N.; AMES B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 113, p. 173-215, 1983.
- MASKAOUI K.; ZHOU J.L.; HONG H.S.; ZHANG Z.L. Contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Jiulong River Estuary and Western Xiamen Sea, China. **Environ. Pollut.**, Barking, v. 118, p. 109-122, 2002.
- MATTHIESSEN P.; LAW R.J. Contaminants and their effects on estuarine and coastal organisms in the United Kingdom in the twentieth century. **Environ. Pollut.**, Barking, v. 120, p. 739-757, 2002.
- MEDEIROS P.M.; BÍCEGO M.C. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbons inputs in sediment using geochemical markers. I. Santos, SP-Brazil. **Mar. Pollut. Bull.**, London, v. 49, n.11, p. 761-769, 2004.
- NETTO A.D.P.; MOREIRA J.C.; DIAS A.E.X.O.; ARBILLA G.; FERREIRA L.F.V.; OLIVEIRA A.S.; BAREK J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Quim. Nova**, São Paulo, v.23, n. 6, p. 765-773, 2000.
- NIPPER M. Current approaches and future directions for contaminant-related impact assessment in coastal environments: Brazilian perspective. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, Philadelphia, v. 3, p. 433-447, 2000.

- NISHIGIMA F.N.; WEBER R.R.; BÍCEGO M.C. Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons in Sediments of Santos and Cananéia, SP, Brazil. **Mar. Pollut. Bull.**, London, v. 422, n.11, p. 1064-1072, 2001.
- OHE T.; WATANABE T.; WAKABAYASHI K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 567, p.109-149, 2004.
- PASCHOAL C.M.B. **Avaliação da qualidade ambiental de Cubatão**. São Paulo, 1996. 143p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais - Universidade de São Paulo.
- PASCHOAL C.M.B. Avaliação da qualidade ambiental de Cubatão. In: VEIGA, J.E. **Ciência Ambiental: primeiros mestrados**. São Paulo: Annablume, 1998. p. 254-276.
- QUANTIN C.; JONER E.J.; PORTAL J.M.; BERTHELIN J. PAH dissipation in a contaminated river sediment under oxic and anoxic conditions, **Environ. Pollut.**, Barking, v. 134, p. 315-322, 2005.
- REEVES W.R.; McDONALD T.J.; CIZMAS L.; DONNELLY K.C. Partioning and desortion behavior of polycyclic aromatic hydrocarbons from disparate sources. **Sic. Total Environ.**, Shannon, v. 332, p. 183-192, 2004.
- ROSS J.R.M; OROS D.R. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the San Fransisco Estuary water column: Sorces, spatial distribution, and temporal trends (1993-2001). **Chemosphere**, Oxford, v. 57, p. 909-920, 2004.
- ROUBICEK D.A. **Estratégias para avaliação da genotoxicidade de sedimentos**. São Paulo, 2003. p. 125. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

- SBMCTA. Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental. **TESTE DE MUTAÇÃO REVERSA COM *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames, Ensaio *Salmonella*/microssoma)**. Disponível em: <http://www.sbmcta.org.br/index.php?arq=doc01>. Acesso em 15 junho 2005.
- 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.
- SHOR L.M.; KOSSON D.S.; ROCKNE K.J.; YOUNG L.Y.; TAGHON G.L. Combined effects of contaminant desorption and toxicity on risk from PAHs contaminated sediments. **Risk Anal.**, New York, v. 24, p. 1109-1120, 2004.
- SKOG K. Blue cotton, Blue rayon and Blue chitin in the analysis of heterocyclic aromatic amines – a review. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 802 (1), p. 39-44, 2004.
- TABAK H.H.; LAZORCHAK J.M.; LEI L.; KHODADOUST A.P.; ANTIA J.E.; BAGCHI R.; SUIDAN M.T. Studies on bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Sediments: Bioavailability, Biodegradability and toxicity issues. **Environ. Toxicol. Chem.**, Houston, v. 22(3), p. 473- 482, 2003.
- UMBUZEIRO G.A.; KUMMROW F.; ROUBICEK D.A.; TOMINAGA M.Y. Evaluation of the water genotoxicity from Santos Estuary (Brazil) in relation to the sediment contamination and effluent discharges. **Environ. Int.**, Oxford, v. 32, p. 359-364, 2006.
- UMBUZEIRO G.A.; FREEMAN H.; WARREN S.H.; KUMMROW F.; CLAXTON L.D. Mutagenicity evaluation of the commercial product CI Disperse Blue 291 using different protocols of the *Salmonella* assay. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 43, p. 49-56, 2005.

- UMBUZEIRO G.A.; ROUBICEK D.A.; RECH C.M.; SATO M.I.Z.; CLAXTON L.D. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the *Salmonella* assay and different water extraction procedures. **Chemosphere**, Oxford, v. 54, p. 1589-1597, 2004b.
- UMBUZEIRO G.A.; ROUBICEK D.A.; SANCHEZ P.S.; SATO M.I.Z. 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.
- UMBUZEIRO G.A.; ROUBICEK D.A.; STOPPE N.C.; RODRIGUES P.F.; RECH C.M.; COIMBRÃO C.A.; SATO M.I.Z. Caracterização de amostras de sedimento hídrico do estuário de Santos utilizando análises de toxicidade aguda e genotoxicidade e quantificação de bactérias dos ciclos biogeoquímicos. **O Mundo de Saúde**, São Paulo, v. 28, n.4, p. 436-443, 2004a.
- 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 – Universidade Estadual de Campinas.
- VENTURINI N.; TOMMASI L.R.; BÍCEGO M.C.; MARTINS C.C. Characterization of the benthic environment of a coastal area adjacent to an oil refinery, Todos os Santos Bay (NE-Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**, São Paulo, v. 52, n. 2, p. 123-134, 2004.
- WALKER S.E.; DICKHUT R.M.; CHISHOLM-BRAUSE C.; SYLVA S.; REDDY C.M. Molecular and isotopic identification of PAH sources in a highly industrialized urban estuarine. **Org. Geochem.**, Oxford, v. 36, p. 619-632, 2005.
- ZHU L.; CHEN B.; WANG J.; SHEN H. Pollution survey of polycyclic aromatic hydrocarbon in surface water of Hangzhou, China, **Chemosphere**, Oxford, v. 56. p. 1085-1095, 2004.

- ZHANG Z.L.; HONG H.S.; ZHOU J.L.; YU G. Phase association of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Minjiang River Estuary, China. **Sic. Total Environ.**, Shannon, v. 323, p. 71-86, 2004.

7. ANEXOS:

Anexo 1 - Evaluation of the water genotoxicity from Santos Estuary (Brazil) in relation to the sediment contamination and effluent discharges (artigo publicado na revista Environment International)

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DOS
ARTIGOS NESTE ARQUIVO

Anexo 2 - Uso do Blue rayon para a extração/concentração de compostos policíclicos em amostras ambientais (artigo publicado na revista Química Nova)

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DOS
ARTIGOS NESTE ARQUIVO

Anexo 3 - Blue rayon e teste Salmonella/microsoma na avaliação da qualidade de águas costeiras (Artigo submetido)

BLUE RAYON E TESTE SALMONELLA/MICROSSOMA NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ÁGUAS COSTEIRAS

BLUE RAYON AND SALMONELLA/MICROSOME ASSAY IN THE EVALUATION OF THE COSTAL WATERS QUALITY

Fábio Kummrow, Doutor, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bl. 13B - Cidade Universitária, CEP 05509-800, São Paulo, SP e Setor de Toxicologia Humana e Saúde Ambiental, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB. Av. Prof. Frederico Hermann Júnior, 345, Alto de Pinheiros, CEP 05459-900, São Paulo, SP;

Dulce Magalhães, Mestre, Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares da Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária, CEP 05508-000, São Paulo, SP;

Alexandre Franco, Mestre, Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 748, bloco 8-superior - Cidade Universitária, CEP 05599-970, São Paulo, SP;

Gisela de Aragão Umbuzeiro, Doutora, Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB. Av. Prof. Frederico Hermann Júnior, 345, Alto de Pinheiros, CEP 05459-900, São Paulo, SP e Professora do Curso de

Toxicologia e Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
- Universidade de São Paulo.

Apoio financeiro CAPES

Endereço para correspondência:

Fábio Kummrow

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB. Avenida
Professor Frederico Hermann Júnior, 345, Alto de Pinheiros, CEP 05459-900,
São Paulo, SP

Tel.: (11) 3030-6565; Fax: (11) 3030-6982; E-mail: fabioik@cetesbnet.sp.gov.br

Este artigo é baseado na tese intitulada “A técnica de Blue rayon *in situ* associada ao teste Salmonella/microsoma como estratégia para o monitoramento de águas estuarinas quanto à presença de compostos policíclicos genotóxicos.”, apresentada para obtenção do grau de doutor na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - Programa da pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas em 2006.

Blue rayon e teste Salmonella/microsoma

Resumo

Objetivo

Desenvolver uma estratégia para o monitoramento passivo das águas do estuário de Santos quanto à presença de atividade genotóxica e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

Métodos

No estuário de Santos foram selecionados e avaliados dois pontos de amostragem com diferentes graus de contaminação em duas campanhas de amostragem utilizando a técnica de Blue rayon *in situ*. Os extratos obtidos foram submetidos ao teste de Salmonella/microssoma em microcrossuspensão com as linhagens TA98, TA100, YG1041 e YG1042 na presença e ausência de ativação metabólica bem como à análises químicas para verificação da aplicabilidade da combinação dessas técnicas de amostragem e de análise em futuro monitoramento da região.

Resultados

O ponto 1, que apresenta sedimento com altas concentrações de HPAs, mostrou maior frequência de resultados positivos para o ensaio Samonella/microssoma e maiores concentrações de HPAs em ambas as campanhas em comparação com o ponto 2, menos contaminado. A linhagem que se mostrou mais sensível foi a YG1041, que permitiu comparações entre locais com diferentes graus de contaminação.

Conclusões

A combinação da técnica de Blue rayon *in situ* com o ensaio

Salmonella/microsoma com a linhagem YG1041 e as análises químicas se mostraram eficientes para a recuperação de compostos genotóxicos bem como dos HPAs analisados, parecendo ser uma estratégia adequada para o monitoramento da qualidade das águas do estuário de Santos.

Descritores: Blue rayon, Salmonella/microsoma, monitoramento, Estuário de Santos.

Abstract

Objective

To develop a strategy for the water quality monitoring of the Santos estuary in relation to the presence of genotoxins and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).

Methods

Two sampling sites with different concentrations levels were selected and evaluated in different samplings using Blue rayon hanging technique. The extracts were tested using the Salmonella/microsome assay in the microsuspension version with strains TA98, TA100, YG1041 and YG1042 in the absence and presence of metabolic activation. Chemical analyses were also performed in order to verify the applicability of the combination of these techniques in future monitoring actions in this specific region.

Results

Site 1, that presents high concentrations of PAHs in the sediment, showed higher frequency of positive results for the Salmonella/microsome assay as well as the higher concentrations of PAHs in both samplings performed in comparison with site 2, less contaminated.

The YG1041 showed greater sensitivity among the test strains allowing comparison between the sites with different levels of contamination.

Conclusions

The combination of the Blue rayon hanging technique associated with the Salmonella/microsome assay using YG1041 strain and chemical analysis were efficient in the recovery of genotoxins as well as the PAHs analyzed in this study. Therefore this strategy seems to be adequate to the water quality

monitoring of the Santos estuary.

Key words: Blue rayon, Salmonella/microsome, monitoring, Santos estuary.

Introdução

Estuários são ecossistemas dinâmicos e produtivos de imenso valor ecológico e econômico, sendo de grande importância a compreensão do transporte e da distribuição dos contaminantes presentes nessas áreas. O Brasil possui 25 regiões metropolitanas das quais 14 estão localizadas em áreas estuarinas onde estão instalados os principais pólos industriais e sistemas portuários. A região da Baixada Santista abriga, além do maior porto da América Latina (Porto de Santos), o maior pólo industrial do país e é considerada como o maior exemplo de degradação ambiental por poluição hídrica e atmosférica, de origem industrial, em ambientes costeiros do Brasil.

^{12, 19, 21}

Muitos trabalhos visando a avaliação da qualidade ambiental deste estuário já foram realizados.^{12, 14, 19, 21} Pôde-se observar grande melhora na qualidade das águas em relação aos contaminantes avaliados¹⁹, porém os sedimentos se apresentam ainda contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)^{12, 14} entres outros compostos. Atividade genotóxica foi também observada nos locais mais impactados.¹⁹

Em relação às águas avaliadas não foram detectados HPAs e a atividade genotóxica foi detectada em níveis muito baixos em alguns pontos específicos, não apresentando correlação direta com os dados obtidos para as amostras de sedimentos¹⁹. Apesar disso, sabe-se que os sedimentos são importantes fontes de contaminação da coluna d'água, especialmente quando ressuspensos (ex.: atividades de navegação e dragagem).^{1, 13}

Os HPAs são contaminantes ambientais ubiqüitários encontrados no ar, no solo e na água. Esses contaminantes são compostos hidrofóbicos com dois

ou mais anéis aromáticos fundidos, gerados durante a queima incompleta de matéria orgânica, naturalmente presentes no meio ambiente (ex.: incêndios florestais naturais) ou relacionados a um série de atividades humanas, destacando-se a produção de carvão Coque e gás, indústrias petroquímicas e produção de óleos combustíveis.¹⁷ Devido à persistência e ao potencial mutagênico/carcinogênico de vários HPAs e seus derivados, têm sido freqüentemente realizados estudos sobre suas fontes/origem, ocorrência, transporte e comportamento nos diferentes compartimentos ambientais.²²

Analisar quimicamente todos os contaminantes genotóxicos e seus produtos de transformação no meio ambiente é uma tarefa bastante complexa. Por isso, bioensaios como o Salmonella/Microsoma (Teste de Ames) têm sido utilizados com sucesso para complementar as análises químicas na caracterização da qualidade das águas e dos sedimentos^{1, 16, 20}, especialmente no que se refere aos HPAs devido a grande sensibilidade desse teste a essa classe de compostos. Como as amostras ambientais são misturas complexas contendo compostos tóxicos e ou genotóxicos, o uso de técnicas seletivas de extração/concentração, como o Blue rayon, e ou procedimentos de “clean up” podem auxiliar a identificação de compostos presentes nos extratos obtidos. Se combinadas com linhagens seletivas de *Salmonella typhimurium* do Teste de Ames, podem sugerir as principais classes de contaminantes genotóxicos presentes no ambiente avaliado.

O Blue rayon é o conjunto de fibras de raiom inertes ligadas covalentemente ao pigmento ftalocianina de cobre tiosulfato e é um adsorvente seletivo para compostos orgânicos policíclicos com 3 ou mais anéis fundidos em sua molécula.⁴ Quando utilizado *in situ* as fibras de Blue rayon

permanecem imersas por 24h nos locais de amostragem e após esse período são recolhidas e levadas ao laboratório para a eluição e preparo dos extratos.

18

A técnica de Blue rayon *in situ* tem sido utilizada com sucesso para a recuperação de HPAs e de compostos com atividade genotóxica ^{6, 7} em ambientes aquáticos especialmente em locais onde, por outros métodos de extração/concentração de amostras, os resultados observados para esses compostos estavam abaixo do limite de detecção. As principais vantagens dessa técnica são: dispensa a coleta de grandes volumes de amostras e maior representatividade da amostragem. ⁸

É reconhecida hoje a necessidade de se monitorar a qualidade das águas do estuário de Santos quanto à presença de compostos mutagênicos tais como os HPAs e seus derivados especialmente em situações onde há ressuspensão de sedimentos contaminados, como durante atividades portuárias. Assim o objetivo desse trabalho é desenvolver uma estratégia para o monitoramento da qualidade das águas do estuário de Santos quanto a presença de HPAs e de atividade mutagênica utilizando as técnicas de Blue rayon *in situ*, análises químicas e o ensaio de Salmonella/microsossoma com as linhagens bacterianas sensíveis a diferentes classes de compostos.

Métodos

Pontos e freqüência de amostragem

Foram selecionados dois pontos de amostragem no estuário de Santos

(Figura 1), sendo o ponto 1 (coordenadas geográficas S 23°52'22.9", W 46°22'44.2") equivalente ao ponto 5 do estudo realizado pela CETESB ¹⁹ e o ponto 2 (coordenadas geográficas S 23°54'17.1", W 46°20'09.1") ao ponto 6 do mesmo estudo. Ambos estão sobre influência direta do regime de maré e recebem a drenagem dos municípios de Cubatão, Santos e Guarujá. A água é salobra nesses pontos. O ponto 1 recebe diretamente o despejo dos efluentes industriais de uma siderúrgica (COSIPA) bem como de esgoto domésticos e seu sedimento apresenta os maiores valores de HPAs da região, chegando ao valor médio de 347 µg/g. ¹⁹ O ponto 2 recebe principalmente esgoto doméstico e seu sedimento apresenta o valor médio de HPAs de 0,6 µg/g. Ambos estão sob influência de atividades portuárias tais como dragagem e navegação. ¹⁹

Implantação do Blue rayon nos pontos de amostragem

Na técnica de Blue rayon *in situ* ¹⁸, as mechas de Blue rayon, previamente lavadas e apresentando resultados negativos para o teste de Salmonella/microsoma em microcrossuspensão ¹⁰, foram acondicionadas em redes de nylon conectadas a uma poita (5 kg) por meio de um cabo de nylon a uma bóia. Os conjuntos foram colocados nos pontos de amostragem e as fibras permaneceram imersas por 24 h. Em cada ponto foram colocados 20 g de Blue rayon, divididos em 4 redes, cada uma com 5 g conectadas a 40 cm da poita, mantendo-se sempre a mesma distância entre o Blue rayon e o sedimento. Após o período de 24 h, o conjunto foi removido e as mechas de Blue rayon foram levadas ao laboratório, em frasco coberto e ao abrigo da luz, para realização dos procedimentos de preparo dos extratos.

Preparo dos extratos orgânicos

As mechas de Blue rayon foram retiradas das redes e lavadas com água ultrapura (18,2 MΩ), para a retirada do material que ficou retido sobre as fibras, e não ligado às moléculas de ftalocianina de cobre tiosulfato, até que a água de lavagem se apresentasse límpida. O excesso de água foi retirado com papel filtro (80 g/m², 50 x 50 cm) limpo e as mechas transferidas para um erlenmeyer para serem eluídas com a solução de metanol/hidróxido de amônio 50:1 v/v na proporção de 200 mL para cada 1 g de Blue rayon. As fibras em contato com a solução de metanol/hidróxido de amônio 50:1 v/v permaneceram sob agitação em agitador mecânico a 120 rpm por 5 períodos de 1 h, trocando-se a solução de eluição a cada ciclo. Após esta etapa, a solução foi coletada em balões de evaporação e o solvente foi eliminado em evaporador rotatório com banho maria a 40 °C. O extrato seco foi ressuspendido em volumes de 3 a 4 mL de metanol e transferido para tubos de vidro limpos com tampa de teflon. Estes extratos foram armazenados à temperatura ambiente e ao abrigo da luz até o momento das análises.

Os extratos foram divididos em alíquotas, que foram submetidas a análises de genotoxicidade através do teste de Salmonella/microsossoma em microssuspensão e ao fracionamento químico em colunas de sílica gel/alumina para “clean up”.

Fracionamento dos extratos orgânicos

Com o objetivo de facilitar a identificação e quantificação relativa dos HPAs foi utilizada a técnica de fracionamento químico em colunas de sílica

gel/alumina descrito por Grifoll *et al.* ². Alíquotas equivalentes 5 a 10 g de Blue rayon, dos extratos obtidos, foram incorporadas a 1 g de alumina ativada e depositada sobre a coluna de fracionamento previamente preparada com 8 g de sílica na porção inferior e 7 g de alumina na porção superior, e lavada com 30 mL de hexano, 30 mL diclorometano (DCM), 30 mL de metanol e 30 mL de éter etílico nesta sequência. Foram utilizadas buretas de vidro de 10/350 mm com torneiras de teflon como suporte para a sílica gel/alumina.

Foram coletadas 6 frações de polaridade crescente, sendo a primeira obtida pela adição de 20 mL de hexano, a segunda por 20 mL de solução 10% de DCM em hexano, a terceira por 40 mL de solução 20% de DCM em hexano, a quarta por 20 mL de solução 75% de DCM em hexano, a quinta por 40 mL de solução 5% de metanol em DCM e a sexta por 40 mL de éter etílico. Todas as frações foram coletadas individualmente e, após a secagem dos solventes sob fluxo de nitrogênio foram submetidas ao teste de Salmonella/microsossoma em microssuspensão para avaliação da atividade genotóxica. As frações número 3, nas quais são esperados os HPAs, foram submetidas a análises cromatográficas para a identificação e quantificação relativa destes compostos. As frações número 5 foram avaliadas preliminarmente por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas.

Foram realizados controles negativos das colunas de sílica gel/alumina através do procedimento integral de fracionamento em colunas que não continham amostra.

Análises cromatográficas para identificação/quantificação relativa de HPAs

Os HPAs mutagênicos benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(e)pireno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno foram avaliados nas frações número 3 de todos os extratos por cromatografia em fase gasosa (CG), visando a sua identificação e quantificação relativa (massa dos HPAs por grama de Blue rayon). Na separação, foi utilizada uma coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) em um cromatógrafo Shimadzu modelo GC-17 equipado com detector de ionização de chama (DIC). Todas as injeções foram realizadas em modo *splitless* e o volume injetado foi de 1 μ L. As temperaturas do detector e do injetor foram 320 °C e 300 °C respectivamente. A temperatura do forno variou de 100 °C (1 min) a 280 °C (26,5 min) com rampa de aquecimento de 8 °C min⁻¹. A identificação dos HPAs nas amostras foi feita por comparação com os tempos de retenção de uma mistura de padrões do fabricante SUPELCO. O método do padrão externo foi usado na quantificação. Foram preparadas seis soluções de concentrações diferentes de uma mistura padrão de 16 HPAs. Foram obtidas 16 curvas, uma para cada componente. Na quantificação do Benzo(e)pireno foi usada a curva do Benzo(a)pireno. Os coeficientes de correlação (R) obtidos para as curvas foram maiores que 0,9990. Os limites de detecção variaram de 0,25 a 1,65 ng. Os resultados são expressos em ng de cada um dos HPAs por grama de Blue rayon pois pela técnica *in situ* não é possível precisar a quantidade de água que entrou em contato com as fibras.

Teste de Salmonella/microsoma em microssuspensão

Os extratos foram submetidos ao teste de Salmonella/microsoma em microssuspensão, que é mais sensível que a técnica convencional ⁵ e mais adequado quando se tem pequenas quantidades de amostra. Foram avaliadas 4 diferentes linhagens (Tabela 1), que detectam diferentes tipos de mutação na presença e ausência de ativação metabólica e, preferencialmente, distintas classes de compostos químicos. O sistema de ativação metabólica utilizado foi a fração S9 de fígado de rato Sprague Dawley induzido com Aroclor 1254 (Moltox, Boone, NC), preparada no momento do ensaio na concentração de 4% v/v com adição dos cofatores adequados. ¹¹

Por se tratar de uma avaliação preliminar da atividade mutagênica, os experimentos foram realizados em dose única, referente à 0,5 g de Blue rayon/placa, em triplicata, tanto para os extratos totais como para suas respectivas frações. A utilização de testes em dose única também se deve à limitada quantidade de extrato orgânico, que impossibilitou a realização de experimentos de dose resposta para a avaliação de potências genotóxicas nas frações e nos extratos totais com as diversas linhagens utilizadas.

O dimetilssulfóxido (DMSO) foi utilizado como solvente para os extratos totais e suas frações e como controle negativo dos experimentos. Os resultados do teste foram apresentados em faixas de razão de mutagenicidade (RM) já que é difícil realizar uma interpretação quantitativa de experimentos de dose única. A RM é calculada pela razão entre o número de revertentes obtidos nas placas teste e o número de revertentes dos controles negativos. Os resultados de RM maior que 2,0 foram considerados como positivos. Os resultados de RM menor que 0,7 foram considerados tóxicos. É possível que a

toxicidade ocorra devido ao excesso de dano no DNA, o que causa a morte das bactérias-teste bem como á presença de outros compostos não genotóxicos; porém, tóxicos às células bacterianas.

Para as linhagens utilizadas neste estudo, respostas positivas na presença de ativação metabólica (mistura S9) e negativas na ausência de ativação metabólica, detectadas preferencialmente em frações apolares, podem ser atribuídas à presença de mutágenos indiretos, como os HPAs não substituídos (ex: benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno e indeno(1,2,3-c,d)pireno).

Resultados

Os resultados do teste de Salmonella/microsossoma em microssuspensão para os extratos totais e frações foram apresentados na Tabela 2 em faixas de razão de mutagenicidade (RM). As taxas de reversão médias obtidas neste trabalho para os controles negativos e positivos na ausência e na presença de S9 em número de revertentes por placa foram apresentados na Tabela 3.

Apesar de tratar-se de uma avaliação preliminar da atividade mutagênica, que testou os extratos e suas frações apenas em dose única, foi possível verificar que o ponto 1, que contém os sedimentos mais contaminados do estuário e está sujeito á influência direta de efluentes de coqueria ¹⁹, apresentou maior freqüência de resultados positivos e valores de RM maiores que o ponto 2 nas duas campanhas. O ponto 2 apresentou resultados positivos apenas para a linhagem YG1041 na presença de S9 nos extratos totais das duas campanhas de amostragem e na fração 5 do extrato da segunda campanha (Tabela 2).

No que se refere a mutagenicidade das frações dos extratos obtidos no ponto 1, observa-se que na primeira campanha as frações de número 2 a 6 apresentaram resultados positivos, sendo mais elevados nas frações 2, 3 e 5 para a TA98, especialmente na ausência de ativação metabólica. Para a YG1041, é provável que as doses testadas tenham sido muito altas, pois observou-se toxicidade tanto para a fração total como para as frações menos polares (de números 1 a 3), o que indica excesso de dano ao DNA ou presença de compostos tóxicos mas não mutagênicos. Na segunda campanha, em relação à linhagem TA98, as frações de número 3, 5 e 6 foram positivas somente na ausência de S9, resultado não observado para o extrato total. Isso se deve, provavelmente, a elevada dose de extrato total utilizada, que leva a um decréscimo das razões de mutagenicidade. No entanto, para a linhagem YG1041, o extrato total apresentou respostas ainda mais altas que as suas respectivas frações. Respostas similares foram observadas para a YG1042/TA100 porém em menor intensidade. Experimentos dose-resposta serão necessários para determinar a potência das frações totais, permitindo à avaliação quantitativa da resposta mutagênica nos pontos estudados.

Os resultados das análises cromatográficas realizadas nas frações 3 dos extratos para identificação/quantificação relativa (em ng/g de Blue rayon) dos HPAs foram apresentados na Tabela 4. A presença de HPAs não substituídos foi verificada nos extratos da primeira campanha em ambos os pontos de amostragem e apenas no ponto 1 na segunda campanha. Foram observadas grandes variações nas concentrações destes compostos, tanto em relação aos pontos como entre as campanhas. Apesar da variabilidade dos dados, as águas do ponto 1 apresentaram concentrações relativamente

maiores dos compostos analisados. Esses compostos poderiam explicar a mutagenicidade obtida, porém apenas aquela dependente de S9. Os resultados dos testes de mutagenicidade apontam também para a presença de outros compostos com atividade genotóxica direta.

Além das frações 3, as frações 5 também indicaram importante atividade mutagênica em ambos os pontos de amostragem. As mesmas foram submetidas a análises químicas preliminares por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. Em ambos os pontos e nas duas campanhas foram detectados os seguintes compostos: 9H-fluoren-9-ona (CAS: 486-25-9), Antraquinona (CAS: 85-68-1), 5H-fenantro[4,5-bcd]piran-5-ona (CAS: 237-02-49-0), 7H-benzo[de]antracen-7-ona (CAS: 82-05-3), Benzo(c)acridina (CAS: 225-51-4), 9-nitroso-9H-carbazol (CAS: 2788-23-0) entre outros. Apenas a Antraquinona, 7H-benzo[de]antracen-7-ona e a Benzo(c)acridina foram descritas como positivas para o teste de Ames. Para os demais compostos não foram encontrados dados na literatura consultada.

Discussão

Em relação ao tipo de atividade mutagênica detectada no ponto 1, foram observados resultados positivos tanto na presença quanto na ausência de mistura S9, nos extratos totais, caracterizando a presença de compostos mutagênicos diretos, que não precisam ser bioativados por enzimas do citocromo P450 (mistura S9) e de compostos dependentes da ativação metabólica. Na segunda campanha a alta resposta do extrato total observada com a linhagem YG1041 em relação à TA98, sugere a presença de nitro-compostos na coluna d'água. Esse resultado é reforçado pela resposta da

YG1042, que também é uma linhagem mais sensível a esta classe de compostos, e também apresentou respostas positivas frente aos extratos das duas campanhas. Os resultados positivos observados no ponto 2 para a linhagem YG1041 na presença de S9 e negativos para a TA98 podem sugerir a presença de compostos com atividade mutagênica indireta, tais como HPAs não substituídos e algumas aminas aromáticas, para as quais esta linhagem é mais sensível.

Apesar das limitações dos resultados obtidos com experimentos de dose única, pode-se observar que as linhagens TA98 e YG1041 se mostraram mais sensíveis aos compostos genotóxicos presentes no ponto 1. Para o ponto 2, apenas a YG1041 apresentou respostas positivas. Portanto os dados sugerem que a YG1041 é mais adequada para o monitoramento da atividade mutagênica das águas desse estuário.

As altas concentrações de HPAs observadas durante a primeira campanha no ponto 1 podem ser atribuídas tanto ao lançamento de efluentes contendo HPAs durante o período de amostragem como ao fluxo de embarcações no cais da siderúrgica (que poderiam estar emitindo descargas contendo HPAs provenientes da queima de combustíveis). Outra causa que não pode ser descartada é a ressuspensão do sedimento através da turbulência que a navegação é capaz de provocar, levando à presença de sedimentos contendo os HPAs ou seus produtos de transformação na coluna d'água.

Na segunda campanha, foram observadas no ponto 1 concentrações mais baixas dos HPAs apesar das elevadas concentrações desses compostos e da atividade genotóxica presente no sedimento desse local.¹⁹ Normalmente,

os HPAs estão presentes em baixas concentrações na coluna d'água devido a sua baixa polaridade. Por isso, tendem a ficar aderidos ao material particulado e ao sedimento.^{9, 15, 19} O trabalho realizado por Nogami *et al.*¹⁵ demonstrou que 60-70% do total de benzo(a)pireno presente em amostras de água estão associados aos sólidos suspensos e apenas o restante solúvel. Assim podemos sugerir que, se não houver ressuspensão do sedimento a tendência é que os HPAs estejam presentes na água em concentrações baixas.

As baixas concentrações de HPAs e a baixa atividade genotóxica observada no ponto 2 são esperadas, uma vez que este local não está sob influência direta de fontes de HPAs, como acontece no ponto 1. Essa baixa contaminação pode ser explicada pela deposição atmosférica e pela navegação existente na região.

Kira *et al.*⁸, utilizando a técnica de Blue rayon *in situ* na região da Ilha Seto (Japão), verificaram a presença de benzo(a)pireno em água salgada em concentrações de 0,5 a 19,5 ng/g de Blue rayon. Nesses extratos foi realizado o teste de Ames em dose única de 0,22 g equivalentes de Blue rayon por placa com a linhagem YG1024 (similar a YG1041) na presença de S9 e os resultados, em RM, variaram entre de 3 e 14. Esses valores de RM foram similares à atividade mutagênica detectada no ponto 1 (Tabela 2). Porém Kira *et al.*⁸ observaram que não há correlação direta entre o aumento nas concentrações de benzo(a)pireno e o aumento na atividade mutagênica. Em outro estudo realizado por Kira *et al.*⁷ na mesma região foram detectadas concentrações de benzo(a)pireno entre 0,09 e 5,71 ng/g de Blue rayon, valores inferiores àqueles observados em 1995.

Comparando-se os resultados da Ilha de Seto com os resultados do

estuário de Santos, verificou-se que este último apresentou concentrações mais elevadas, chegando a até 1290,9 ng/g de Blue rayon. Os resultados do teste de Salmonella/microsossoma em microssuspensão, obtidos neste trabalho, também não sugerem uma correlação entre as concentrações de HPAs e a mutagenicidade detectada.

Conclusões

A técnica de Blue rayon *in situ* mostrou-se eficiente na recuperação de compostos policíclicos com atividade mutagênica. As análises químicas e o teste de mutagenicidade realizado indicaram que, além dos HPAs, outros compostos mutagênicos estão presentes nas águas do estuário de Santos.

A combinação do ensaio Salmonella/microsossoma em microssuspensão com técnica de Blue rayon *in situ* parece ser uma estratégia adequada para o monitoramento eficiente da qualidade das águas dessa região em relação à presença de compostos genotóxicos, complementando as análises químicas. Entre as linhagens de Salmonella avaliadas neste trabalho a YG1041 se mostrou mais sensível e adequada para o monitoramento da qualidade das águas do estuário de Santos quanto a presença de compostos policíclicos genotóxicos sendo capaz de discriminar locais com diferentes graus de contaminação.

Referências

1. Chen G, White PA. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutat Res* 2004; 567: 151-225.
2. Grifoll M, Solanas AM, Bayona JM. Characterization of genotoxic compounds in the sediment by mass spectrometric technics combined with Salmonella/microsome test. *Arch Environ Contam Toxicol* 1990; 19: 175-184.
3. Hagiwara Y, Watanabe M, Oda Y, Sofoni T, Nohmi T. Specificity and sensitivity of Salmonella typhimurium YG1041 and YG1042 strain possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. *Mutat Res* 1993; 291: 171-180
4. Hayatsu H. Cellulose bearing covalently linked copper phthalocyanine trisulphonate as na adsorbent selective for polycyclic compounds and its use in studies of environmental mutagens and carcinogens. *J Chromatogr* 1992; 597: 37-56.
5. Kado NY, Langley D, Eisenstadt E. A simple modification of the Salmonella liquid incubation assay. *Mutat Res* 1983; 121: 25-32.

6. Kira S, Ito T, Hayatsu H, Taketa K, Zheng Y, Li R, Holliday TL, Giam CS. Detection of waterborne mutagens and characterization of chemicals in selected galveston sites after an oil spill. *Bull Environ Contam Toxicol* 1994; 53: 285-291.
7. Kira S, Nogami Y, Ito T, Hayatsu H. Measurement of a time-weighted average concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater: an improved procedure of Blue Rayon hanging technique for monitoring Benzo(a)pyrene. *Mar Environ Res* 1998; 46: 267-271.
8. Kira S, Taketa K, Nogami Y, Hayatsu H. A simple technique for monitoring mutagenicity and Benzo(a)pyrene content in mussels and their ambient water. *Environ Toxicol Water Qual* 1995; 10: 167-172.
9. Kot-Wasik A, Debska J, Namiesnik J. Monitoring of organic pollutants in coastal waters of Gulf of Gdansk, Southern Baltic. *Mar Pollut Bull* 2004; 49: 264-276.
10. Kummrow F, Rech CM, Coimbra CA, Roubicek DA, Umbuzeiro GA. Comparison of the mutagenic activity of XAD4 and blue rayon extracts of surface water and related drinking water samples. *Mutat Res* 2003; 541: 103-113.
11. Maron DN, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113: 173-215.

12. Medeiros PM, Bicego MC. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbons inputs in sediment using geochemical markers. I. Santos, SP-Brazil. *Mar Pollut Bull* 2004; 49 (11): 761-769.
13. Nipper M. Current approaches and future directions for contaminant-related impact assessment in coastal environments: Brazilian perspective. *Aquatic Ecosystem Health and Management* 2000; 3: 433-447.
14. Nishigima FN, Weber RR, Bicego MC. Aliphatic and aromatic hidrocarbons in sediments of Santos and Cananéia, SP, Brazil. *Mar Pollut Bull* 2001; 42 (11): 1064-1072.
15. Nogami Y, Imaeda R, Ito T, Kira S. Benzo(a)pireno adsorbed to suspended solids in fresh water. *Environ Toxicol* 2000; 15: 500-503.
16. Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat Res* 2004; 567: 109-149.
17. Quantin C, Joner EJ, Portal JM, Berthelin J. PAH dissipation in a contaminated river sediment under oxic and anoxic conditions, *Environ Pollut* 2005; 134: 315-322.
18. Sakamoto H, Hayatsu H. A simple method for monitoring mutagenicity of river water. Mutagens in Yodo river system, Kyoto- Osaka. *Bull Environ Contam Toxicol* 1990; 44: 521- 528.

19. Umbuzeiro GA, Kummrow F, Roubicek DA, Tominaga MY. Evaluation of the water genotoxicity from Santos Estuary (Brazil) in relation to the sediment contamination and effluent discharges. *Environ Int* 2006; 32: 359-364.
20. Umbuzeiro GA, Roubicek DA, Sanchez PS, Sato MIZ. The *Salmonella* mutagenicity assay in surface water quality monitoring program based on a 20-year survey, *Mutat Res* 2001; 491: 119-126.
21. Umbuzeiro GA, Roubicek DA, Stoppe NC, Rodrigues PF, Rech CM, Coimbra CA, Sato MIZ. Caracterização de amostras de sedimento hídrico do estuário de Santos utilizando análises de toxicidade aguda e genotoxicidade e quantificação de bactérias dos ciclos biogeoquímicos. *O Mundo de Saúde* 2004, 28 (4): 436-443.
22. Zhu L, Chen B, Wang J, Shen H. Pollution survey of polycyclic aromatic hydrocarbon in surface water of Hangzhou, China, *Chemosphere* 2004; 56: 1085-1095.

Figura 1: Pontos de amostragem no estuário de Santos avaliados neste trabalho.

Tabela 1: Genótipo, tipo de mutação preferencialmente detectada e controles positivos das linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas neste estudo.

Linhagem de <i>Salmonella</i>	Genótipo	Tipo de mutação detectada no DNA	Referência	Controles positivos	
				- S9	+ S9
TA98	<i>HisD3052, rfa, Δbio, ΔuvrB, pKM101</i>	Deslocamento no quadro de leitura	11	4-NQO (0,125 μg/placa)	2AA (0,625 μg/placa)
TA100	<i>HisG46, rfa, Δbio, ΔuvrB, pKM101</i>	Troca de par de bases	11	4-NQO (0,125 μg/placa)	2AA (0,625 μg/placa)
YG1041	<i>HisD3052, rfa, Δbio, ΔuvrB, pKM101, pYG233</i> (produção aumentada das enzimas acetiltransferase e nitroredutase)	Deslocamento no quadro de leitura	3	4-NOP (5μg/placa)	2AA (0,03125 μg/placa)
YG1042	<i>HisG46, rfa, Δbio, ΔuvrB, pKM101, pYG233</i> (produção aumentada das enzimas acetiltransferase e nitroredutase)	Troca de par de bases	3	2-NF (2,5 μg/placa)	2AA (0,625 μg/placa)

4-NQO - 4-nitroquinolina-1-óxido

2-AA - 2-aminoantraceno

4-NOP - 4-nitro-o-diamino-fenilina

2-NF - 2nitrofluoreno

TABELA 2. Resultados obtidos no teste de Kado, em faixas de RM (razão de mutagenicidade) para os pontos 1 e 2, com as linhagens TA 98, YG 1041, TA 100 e YG 1042, na presença e na ausência de ativação metabólica (mistura S9).

Frações	Campanhas	TA 98		YG 1041		TA 100		YG 1042	
		- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
Ponto 1									
Total	I			Tox		NR	NR		
	II								
F - 1	I								
	II			Tox	Tox				
F - 2	I			Tox	Tox				
	II								
F - 3	I			Tox					
	II								
F - 4	I								
	II								
F - 5	I								
	II								
F - 6	I								
	II								
Ponto 2									
Total	I								
	II								
F - 1	I								
	II								
F - 2	I								
	II								
F - 3	I								
	II								
F - 4	I								
	II								
F - 5	I								
	II								
F - 6	I								
	II								

Legenda:

Tox RM <0,7 0 — 2 2 — 4 4 — 6 >6

* NR - Teste não realizado

Tabela 3: Número médio de revertentes por placa das linhagens de *Salmonella typhimurium* na ausência e na presença de S9 para os controles negativos e positivos utilizados neste trabalho.

Controles	TA98		YG1041		TA100		YG1042	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
Negativos	27	26	120	99	114	120	88	84
Positivos*	404	874	1480	351	1786	1943	1092	299

* consultar a tabela 1 para informações sobre os compostos e doses utilizadas

Tabela 4. Identificação e quantificação dos HPAs nas frações 3 dos extratos de ambos os pontos, das duas campanhas com as concentrações em ng/g de Blue rayon.

HPAs	.R. Padrão Branco		Ponto 1		Ponto 2	
			Campanha I		Campanha II	
			Campanha I	Campanha II	Campanha I	Campanha II
Benzo(a)antraceno	22,492	0,6	2625,4	24,0	2,0	-
Criseno	22,604	-	2761,6	42,1	4,0	-
Benzo(b)flurantino	25,805	-	957,7	12,5	-	-
Benzo(k)flurantino	25,888	1,0	906,2	2,7	4,1	-
Benzo(e)pireno	26,795	-	878,5	21,4	-	-
Benzo(a)pireno	26,871	1,1	1290,9	11,5	-	-
Indeno(1,2,3-CD)pireno	32,550	-	374,7	-	-	-
Dibenzo(A,H)antraceno	32,781	-	163,0	-	-	-
Benzo(G,H,I)pirileno	34,103	-	133,8	14,8	-	-
Somatório dos HPAs	-	2,7	10091,8	129,0	10,1	-

Anexo 4 - Blue rayon anchored technique/Salmonella microsome microsuspension assay as a tool to monitor for genotoxic polycyclic compounds in Santos estuary (Artigo submetido)

Blue rayon anchored technique/Salmonella microsome microsuspension assay as a tool to monitor for genotoxic polycyclic compounds in Santos estuary

Fábio Kummrow ^{a, b, *}, Célia M. Rech ^b, Carlos A. Coimbra ^b, Gisela A. Umbuzeiro ^{a, b}

^a *Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, 05508-900 São Paulo, Brazil*

^b *CETESB - Cia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345, 05459-900 São Paulo, Brazil*

Corresponding author: Tel: +55-11-30306531; Fax: +55-11-30306982; E-mail:

fabio.k@usp.br

Abstract

The most important harbor of Brazil is located in Santos Estuary. In the 1970s, this area was one of the major examples of coastal degradation and although the quality of the environment has improved, the sediment is still contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and mutagenic activity. Because of sediment dredging and consequently contaminants resuspension, it is useful to have reliable methods to monitor the water quality. Considering that Blue rayon (BR) has been successfully used in evaluation of mutagenicity and PAHs content the objective of this work was to verify the applicability and adapt the methodology to monitor the water for mutagenic activity using the BR associated with the Salmonella assay. Analysis of three sites with different levels of contamination were performed using a modification of the BR hanging method denominated in this work BR anchored technique. The microsuspension protocol of the Salmonella/microsome assay was employed with the strain YG1041. The water from

the site1 the most contaminated and under influence of the steel mill discharge presented the highest potency reaching 36,000 rev./g of BR with S9. Sites 2 and 3 showed less mutagenicity than site 1 with values ~1,000 rev./g of BR. We conclude that the BR anchored technique associated with Salmonella assay using YG1041 is a reliable alternative to monitor estuarine waters, especially in regions where sediment resuspension or acute pollution episodes can occur.

Keywords: Blue rayon; mutagens; water monitoring; estuarine waters; Santos estuary; Salmonella/microsome

1. Introduction

Santos estuary, located in southeastern São Paulo State, is economically important considering that it is the major Latin American harbor and the largest industrial complex of Brazil, including steel mill, fertilizer and chemical industries located in this area [1]. In the 1970s, it was considered one of the major examples of coastal degradation [2] and although the quality of the environment has improved in the last years in relation to the chemical parameters and toxicity due to enforcement actions, unfortunately the sediment is still contaminated especially with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and mutagenic activity [1-5]. In the most contaminated areas total PAHs can reach 347.55 µg/g of sediment (dry weight) [2] and 720,000 revertants per gram of sediment (dry weight) [6]. The contaminants present in the sediment, adsorbed or not to particles, can adversely affect the sediment-associated community, as well as be resuspended into the water column by navigation and dredging activities affecting the water quality and the aquatic organisms [7].

Umbuzeiro et al. [6], evaluated the genotoxic activity of samples from Santos

estuary and observed that only low levels of mutagenic activity were present in the water, despite of the high levels of PAHs and mutagenic activity in the sediment of some of the sites evaluated. They considered that the extraction/concentration method (XAD-4) and the Salmonella strains used (TA98 and TA100) were not sensitive enough to detect the genotoxic activity suspected to be present in the water of the most contaminated areas. The total PAHs in the water of these sampling sites were below the detection limits of the method applied [2]. In another area from Brazil, Paraíba do Sul river (Rio de Janeiro State), at a site impacted by an important steel mill plant discharge, Benzo(a)pyrene was detected in the water in concentrations ranging from 0.03 µg/L to 1.2 µg/L [8]. In the sediments of the same area the sum of 12 different PAHs varied from 5.1 to 40.8 ng/g [9].

Considering that the PAHs and other hydrophobic organic compounds present in the aquatic environment will be preferentially adsorbed to the sediment particles, dredging or any resuspension of the sediment can cause adverse effects to the exposed biota or humans [10]. Brazil established a resolution that regulates dredging activities which includes chemical and toxicological criteria (CONAMA 344) [11]. Considering the occurrence of sediment dredging for the maintenance of the port activities in the Santos Estuary (around 3 millions m³ per year) and possible contaminants resuspension, it is very useful to have reliable methods to evaluate and monitor the water of this estuary for mutagenic activity as well as PAHs among other compounds.

Since the mid-1980s Blue cotton, Blue rayon and Blue chitin have been used as sample extraction/concentration technique specifically for investigations of mutagenic activity where polycyclic compounds were involved or suspected [12]. The Blue rayon hanging technique has been successfully used in evaluation of mutagenicity and PAHs content in coastal waters [13-15]. Blue rayon adsorbent is composed of fibers of rayon

covalently bound to copper phthalocyanine trisulphonate and it is selective for polycyclic compounds with three or more fused rings [16]. When used in the hanging technique, the fibers stay immersed in the sampling site for 24 h allowing a representative sampling [17].

In Santos Estuary, Kummrow et al. [18] using a combination of the Blue rayon hanging technique and Salmonella/microsome microsuspension assay in single doses with the strains TA98, TA100, YG1041 and YG1042, found that the water of the most contaminated area presented the higher values of mutagenic activity and the YG1041 (Table 1) was the most sensitive strain. The same authors also showed that the Benzo(a)anthracene, Chrysene, Benzo(b)fluoranthene, Benzo(k)fluoranthene, Benzo(a)pyrene, Benzo(e)pyrene, Indeno(1,2,3-cd)pyrene, Dibenzo(a,h)anthracene and Benzo(g,h,i)perylene were present in the Blue rayon extracts.

The objective of this work was to verify the applicability and adapt the methodological conditions to monitor the water quality of the Santos estuary for mutagenic activity in a two year study using, a modified sampling method denominated Blue rayon anchored technique associated with the Salmonella/microsome microsuspension assay.

2. Material and methods

2.1. Sampling sites

Three different sites with different sources and levels of contamination were selected (Figure 1). Site 1 - in front of the steel mill, located in the estuary, is the most contaminated area, receives discharges from the steel mill plant and sewage and the sediment can reach 347.55 µg/g of sediment (dry weight). Site 2 - Caneus Island, located in the estuary near to Santos harbor, is less impacted than site 1 and domestic

sewage is the only direct identified pollution source. Both sites 1 and 2 are under influence of port activities like navigation and dredging. Site 3 - Queiroz River is a water body located in a less impacted region of this estuary [2]. The 5 samplings were performed from May of 2003 to October of 2004.

2.2. Blue rayon anchored technique

The samplings were performed using a modification of the Blue rayon hanging technique [17] denominated in this work Blue rayon anchored technique. Amounts of 10g of Blue rayon were divided in two nylon nets, the nets were attached to an anchor using a nylon cord 40cm long, and connected to a floating device (Figure 2). This apparatus was immersed in the sampling sites for 24 hours. Blue rayon fibers were washed and tested for mutagenicity activity with the strain YG1041 and only when they showed negative results they were used [19]. After the 24 hour period the Blue rayon fibers were taken out, transferred for beakers and transported to the laboratory in boxes protected from the light. Before the elution, Blue rayon fibers were washed with ultra-pure water in order to remove the non-adsorbed compounds and solids. After this step, the Blue rayon fibers were dried with clean paper towels and eluted with methanol/ammonia (50:1 v/v) in the proportion of 1 g of Blue rayon to 200 ml of elution solution [19]. The eluates were reduced to 2-3 mL using a rotary evaporator, transferred to vials, evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen and resuspended in Dimethylsulfoxide (DMSO) just before testing.

2.3. Salmonella/microsome microsuspension assay

The microsuspension protocol of the Salmonella/microsome assay described by Kado et al. [20], was employed, and the strain of *Salmonella typhimurium* YG1041

(*HisD3052*, *rfa*, Δ *bio*, Δ *uvrB*, pKM101, pYG233) overproducing acetyltransferase and nitroreductase enzymes. The positive controls used were 4-Nitro-O-phenylenediamine (4-NOP - CAS.: 99-56-9) (INC Biomedicals Inc.), 2.5 μ g/plate, without S9 mix and 2-Aminoanthracene (2AA - CAS.: 613-13-8) (Sigma-Aldrich), 0.03125 μ g/plate, with S9 mix. The S9 mix was freshly prepared before each test using lyophilized Aroclor-1254-induced rat liver S9 fraction (Moltox - Molecular Toxicology Inc., Boone, NC, USA), prepared according to Maron and Ames [21].

The assays were performed using triplicate plates and the doses for both, presence and absence of S9, ranged from 3.12 to 200 mg of Blue rayon/plate. The results were analyzed with the Salanal computer program, and for the samples that showed a positive ANOVA, the potencies were calculated using the Bernstein model [22] and expressed in revertants/g of Blue rayon. Toxicity was evaluated by the careful inspection of the background. Samples were considered positive when there was a significant statistical difference among the tested doses and the negative control (ANOVA) and the highest value obtained in any tested dose were above 182 revertants per plate. This value represents the maximum number of revertants per plate in the negative controls statistically calculated at 95% of confidence (percentile 95%) for 311 observations historically obtained in our laboratory.

For comparison of the sensitivity of the YG1041 in relation to a non-substituted PAH (Benzo(a)pyrene) (Sigma-Aldrich) and a substituted PAH (2-Aminoanthracene) (Sigma-Aldrich) a dose-response experiment was performed using the same protocol applied for the Blue rayon extracts.

3. Results and discussion

The dose response results obtained in the Salmonella/microsome microsuspension assay, the calculated potencies and the confidence intervals obtained for the samples analyzed were presented in Table 2. The water from the site with the most contaminated sediment and under direct influence of the steel mill discharge (site 1) presented the highest mutagenic activity reaching 36,000 revertants per gram of Blue rayon in the presence of S9. Sites 2 and 3 showed much less mutagenic activity than site 1 with values around 1000 revertants per gram of Blue rayon (Table 2). In relation to the type of the mutagenicity detected, site 1 showed a different profile when compared to site 2 and 3. For site 1 we can observe a dramatically increase in the mutagenic activity when the S9 mix was added in 4 of the 5 samples performed analyzed.

In order to compare results of mutagenicity using the Blue rayon hanging technique Ohe et al. [23], proposed the following classification based on the number of revertants per gram of Blue rayon: low (Not Detected-1000); moderate (1,000-10,000); high (10,000-100,000) and extreme (greater than 100,000). Although this classification was developed for the strain of *Salmonella typhimurium* YG1024 (*HisD3052*, *rfa*, Δ *bio*, Δ *uvrB*, *pKM101*, *pYG219*), considering that this strain is quite similar to the YG1041 used in this study [24] this classification was applied to analyze the results. The mutagenic activity detected in site 1 - in front of the steel mill, can be considered from moderate to high and from site 2 and 3, low to moderate (Table 2) according to the cited classification.

The mutagenicity results of a non-substituted PAH, Benzo(a)pyrene and a substituted PAH, 2-Aminoanthracene for the YG1041 using the same protocol used to analyzed the Blue rayon were presented in Table 3. The potencies observed in the dose-response experiment for the Benzo(a)pyrene were negative for the YG1041 without S9

and 340 revertants/ μg with S9 and for 2-Aminoanthracene were 1,400 without S9 and 14,000 revertants/ μg with S9.

In the original procedure of the Blue rayon hanging technique the nets containing the adsorbent fibers are attached in the floating device, staying close to the surface of the water [17]. In this study we attached the nets ~ 40 cm above the anchor in order to maintain the Blue rayon fibers always at the same distance from the sediments (around 50-60 cm) because we suspected that the contaminated sediments could be an important source of mutagenic compounds via resuspension of the sediment and/or desorption of the contaminants. Other authors studied the effect of the distance of the Blue rayon from the surface and observed a similar mutagenic activity when the blue rayon was attached both at 20-30 cm and at 50-60 cm depth from the surface, but no information about the depth of those areas were provided [14]. The advantage of using the anchored Blue rayon technique at a standardized distance from the bottom sediment, besides the ability of adsorbing contaminants derived from the release of industrial discharges and/or runoff, is the possibility to extract contaminants that are being released from the bottom sediment allowing comparisons in coastal areas, where depth variations occurs.

Although direct human exposure to genotoxic compounds and PAHs in the bottom sediment is considered minimal, their release to the water column during dredging operations, episodes of high scouring, or leaching from confined facilities poses a treat to aquatic ecosystems and consequently a potential threat to human health via bioconcentration of those compounds the aquatic organisms [10]. Although the dredging in the most contaminated area of the Santos estuary (the region where the site 1 is located) is at the moment prohibited, this operation will occur in controlled situation in the future and the resuspension of the sediment containing genotoxic compounds

could turn those contaminants available in the water column, affecting the water quality. In the Galveston Bay, using the Blue rayon hanging technique, Kira et al. [13] observed the highest mutagenicity (TA98 +S9) at sites near where an oil spill occurred with maximum values of 5,656 revertants per 0.16 g of Blue rayon/plate. These values are higher than the ones observed in our study (Table 2). Probably this is because the sampling was performed just after an oil spill.

Based in the results previously obtained by Kummrow et al. [18] that evaluated the performance of four strains of *Salmonella* (Table 1) to detect the mutagenic activity from the extracts obtained using the Blue rayon anchored technique from 2 sites of Santos estuary (the same sites 1 and 2 of this study), we have chosen the strain YG1041, with and without S9 mix, to be used in this study considering its higher sensitivity. In this study, mutagenic activity was detected in the water, and the higher results were observed in the sampling site located in the most contaminated area (site 1). This site showed an increased response in the presence of S9 mix, indicating that non-substituted PAHs could be contributing to the detected effect. Because of the high sensitivity of YG1041 for nitrocompounds and aromatic amines these classes of mutagenic compounds could not be ruled out.

Comparing the profile of mutagenicity observed for the sediment samples from site 1 (2,100 and 31,000 revertants per g for TA98 without and with S9) [4, 6] we can observe that it is similar to the water mutagenic activity detected in our work. These data suggest that the sources of genotoxic compounds in these estuarine waters could be the sediment desorption and/or sediment resuspension but industrial effluent discharge could be excluded.

The results obtained in the sites 2 and 3 were very similar to each other presenting around 1,000 revertants per g of Blue rayon. Considering that those areas are

much less contaminated as showed in previous studies [2, 5] we suggest that this value could be considered as a background response for this area. More studies are in progress to determine background values in protected areas of the Santos estuary.

The strategy that uses the Blue rayon anchored technique associated to the Salmonella/microsome microsuspension assay with the strain YG1041 seems to be more sensitive and adequate to detect mutagenic activity in the Santos estuarine waters than the one applied by Umbuzeiro et al. [6]. The significantly higher mutagenicity in the metabolically enhanced diagnostic strains (e.g., YG1041) with metabolic activation (S9) (Table 3) suggests the presence of aromatic amine-type mutagens and non-substituted PAHs. In the absence of S9 mix other direct-acting polycyclic compounds, including substituted PAHs, could explain the observed mutagenicity. According to the potencies of the pure compounds analyzed, as shown in Table 3, 1 μg of Benzo(a)pyrene could explain $\sim 10^2$ revertants and 1 μg of 2-Aminoanthracene could explain $\sim 10^5$ revertants. Another evidence that substituted PAHs could be present in the water column is that they are more polar than the non-substituted PAHs. Further chemical analysis should be performed in order to identify the mutagenic compounds that are causing the observed effects as described by Hewitt and Marvin [12].

4. Conclusions

We conclude that the Blue rayon anchored technique associated with Salmonella/microsome microsuspension assay and the YG1041 strain can be a reliable alternative to monitor estuarine waters for mutagenic compounds, especially in regions where sediment resuspension or acute pollution episodes can occur.

Our results also indicate that the Santos estuarine waters contain mutagenic compounds other than non-substituted PAHs, and considering the high sensitivity of the

YG1041 for nitro and aromatic amines compounds these group of contaminants could be accounting for the observed mutagenic activity.

Acknowledgements

The authors thank, Paulo Fernando Rodrigues, Deborah A. Roubicek, Francisco José V. de Castro, Wallace Anderson Soares, Genival de Oliveira, Angela Maria Cafruni, Osvaldo A. da Silva, Paulo Lobeira (in memoriam) from CETESB for technical assistance. We also thank Marta Condé Lamparelli, José Eduardo Bevilacqua, Elizabeth de Souza Nascimento, Wilson de Figueiredo Jardim, Ernani Pinto, Silvia Berlanga de Moraes Barros for the valuable comments and suggestions and Eduardo Viviani de Carvalho for the illustration. This article does not necessarily reflect the views of CETESB and no official endorsement should be inferred.

References

- [1] P.M. Medeiros, M.C. Bicego. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbons inputs in sediment using geochemical markers. I. Santos, SP-Brazil, Mar. Pollut. Bull. 49 (11) (2004) 761-769.
- [2] CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Relatório Sistema Estuarino Santos São Vicente – Agosto de 2001. Available from www.cetesb.sp.gov.br/Agua/agua_geral.asp/; 2001.
- [3] F.N. Nishigima, R.R. Weber, M.C. Bicego. Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons in Sediments of Santos and Cananéia, SP, Brazil, Mar. Pollut. Bull. 42 (11) (2001) 1064-1072.
- [4] D.A. Roubicek. Estratégias para avaliação da genotoxicidade de sedimentos, Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (2003) 1-125.
- [5] G.A. Umbuzeiro, D.A. Roubicek, N.C. Stoppe, P.F. Rodrigues, C.M. Rech, C.A. Coimbra, M.I.Z. Sato. Caracterização de amostras de sedimento hídrico do estuário de Santos utilizando análises de toxicidade aguda e genotoxicidade e quantificação de bactérias dos ciclos biogeoquímicos, Mundo Saúde 28 (4) (2004) 436-442.
- [6] G.A. Umbuzeiro, F. Kummrow, D.A. Roubicek, M.Y. Tominaga. Evaluation of the water genotoxicity from Santos Estuary (Brazil) in relation to the sediment contamination and effluent discharges, Environ. Int. 32 (2006) 359-364.
- [7] M. Nipper. Current approaches and future directions for contaminant-related impact assessment in coastal environments: Brazilian perspective, Aquatic Ecosystem Health and Management 3 (2000) 433-447.

- [8] D.A. Azevedo, E. Gerchon, E.O. Reis. Monitoring of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in water from Paraíba do Sul River, Brazil, *J. Braz. Chem. Soc.* 15 (2) (2004) 292-299.
- [9] J.P.M. Torres, O. Malm, E.D.R. Vieira, J. Japenga, G.F. Koopmans. Organic micropollutants on river sediments from Rio de Janeiro State, Southeast Brazil, *Cad. Saúde Pública* 18 (2) (2002) 477-488.
- [10] H.H. Tabak, J.M. Lazorchak, L. Lei, A.P. Khodadoust, J.E. Antia, R. Bagchi, M.T. Suidan. Studies on bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Sediments: Bioavailability, Biodegradability and toxicity issues, *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (3) (2003) 473-482.
- [11] Brazil. Resolução – Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras, e dá outras providências, *DOU* 87 (2004) 56-57.
- [12] L.M. Hewitt, C.H. Marvin. Analytical methods in environmental effects-directed investigation of effluents, *Mutat. Res.* 589 (2005) 208-232.
- [13] S. Kira, T. Ito, H. Hayatsu, K. Taketa, Y. Zheng, R. Li, T.L. Holliday, C.S. Giam. Detection of waterborne mutagens and characterization of chemicals in selected Galveston sites after an oil spill, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53 (1994) 285-291.
- [14] S. Kira, K. Taketa, Y. Nogami, H. Hayatsu. A simple technique for monitoring mutagenicity and Benzo(a)pyrene contents in mussels and their ambient water, *Environ. Toxicol. Water Qual.* 10 (1995) 167-172.
- [15] S. Kira, Y. Nogami, T. Ito, H. Hayatsu. Measurement of a Time-Weighted Average Concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater: An improved procedure of Blue rayon hanging technique for monitoring Benzo(a)pyrene, *Mar. Environ. Res.* 46 (1998) 267-271.

- [16] H. Hayatsu. 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.* 597 (1992) 37-56.
- [17] H. Sakamoto, H. Hayatsu. A simple method for monitoring mutagenicity of river water. Mutagens in Yodo river system, Kyoto- Osaka, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44 (1990) 521-528.
- [18] F. Kummrow, D. Magalhães, A. Franco, G.A. Umbuzeiro. Blue rayon e teste de *Salmonella*/microsoma na avaliação da qualidade de águas costeiras, *Rev. Saúde Publica* – submitted.
- [19] F. Kummrow, C.M. Rech, C.A. Coimbra, D.A. Roubicek, G.A. Umbuzeiro. Comparison of the mutagenic activity of XAD4 and blue rayon extracts of surface water and related drinking water samples, *Mutat. Res.* 541 (2003) 103-113.
- [20] N.Y. Kado, D. Langley, E. Eisenstadt. A simple modification of the *Salmonella* liquid incubation assay, *Mutat. Res.* 121 (1983) 25-32.
- [21] Maron DN, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test *Mutat Res* 1983;113:173-215.
- [22] L. Bernstein, J. Kaldor, J. McCann, M.C. Pike. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test, *Mutat. Res.* 97 (1982) 267-287.
- [23] T. Ohe, T. Watanabe, K. Wakabayashi. Mutagens in surface waters: a review, *Mutat. Res.* 567 (2004) 109-149.
- [24] P.D. Josephy, P. Gruz, T. Nohmi. Recent advances in the construction of bacterial genotoxicity assay, *Mutat. Res.* 386 (1) (1997) 1-23.

Table 1. Results expressed in range of Mutagenic Ratio (MR), that is calculated dividing the mean of the number of revertants per plate for the tested dose by the mean of the negative control, using the Salmonella/Microsuspension assay in a single dose experiment (0.5 g of Blue rayon per plate) for sites 1 and 2 obtained previously by Kummrow et al. [18].

Sampling site	sampling	TA98		YG1041		TA100		YG1042	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Site 1	I			Tox.		NP	NP
	II
Site 2	I
	II

NP - Not Performed

Tox. - Toxic (MR<0.7)

Mutagenic Ratio ranges:

Table 2: Results of the Salmonella/microsome microsuspension assay in dose response experiment with the YG1041 in the presence and absence of S9 mix for the 3 sites evaluated and 5 different samplings expressed in number of revertants per gram of Blue rayon (BR).

NP: Not Performed

(-): Dose not tested

(a): Number of revertants/g of Blue rayon (BR) calculated using the Bernstein model and in parenthesis the 90% confidence interval

(b): Classification according Ohe et al. [23]

(c): For positiveness criteria see Material and Methods

([#]): Mutagenic potency estimated, although linear model not statistically significant

(*): Significant at 5% (ANOVA)

(**): Significant at 1% (ANOVA)

Table 2:

Site 1 (in front of the steel mill)										
Sampling	1		2		3		4		5	
Doses mg/plate	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0.00	107.6	90.8	137.6	114.4	137.6	114.4	107.6	100.2	95.4	85.6
3.12	-	-	-	-	-	-	-	184.5**	-	-
6.25	115.0	136.5**	145.0	175.5**	205.5**	384.0**	133.0*	265.0**	-	-
10.0	-	-	-	-	-	-	-	-	167.0	226.0**
12.50	133.0**	251.5**	149.5	229.5**	242.0**	523.5**	159.0*	361.0**	-	-
25.00	142.0	427.0**	180.0	348.0**	275.5**	642.5**	226.0**	402.0**	193.0**	264.0**
50.00	157.0**	475.0**	221.5**	386.5**	377.0**	816.5**	266.0**	473.5**	231.5**	193.5**
100.00	192.0**	522.0**	352.0**	524.5**	342.0**	854.5**	535.0**	582.5**	286.5**	317.5**
200.00	227.0**	573.0	824.0**	832.0**	265.0**	856.5**	819.5**	783.0**	260.5**	368.0**
Potency (a)	870 (760 - 970)	13,000 (11,200 - 13,600)	3,400 (3,000 - 3,700)	9,300 (8,400 - 10,100)	5,100 (4,300 - 5,800)	36,000 (33,100 - 37,800)	3,700 (3,400 - 3,900)	23,000 (19,800 - 25,300)	690 [#]	1,100 [#]
Classification (b)	low	high	moderate	moderate	moderate	high	moderate	high	low	moderate

Site 2 (Caneus Island)										
Doses mg/plate	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0.00	107.6	90.8	137.6	114.4	137.6	114.4	107.6	90.8	95.4	85.6
3.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.25	131.0	101.5	144.0	130.0*	135.0	119.5	118.5	160.0**	-	-
10.0	-	-	-	-	-	-	-	-	90.5	93.5
12.50	132.5**	115.0*	150.0	131.5	142.5	135.5	94.5	180.5**	-	-
25.00	154.0**	136.0*	169.5	147.0*	147.0	184.5**	111.5	199.0**	105.0	95.0
50.00	167.5*	201.5**	207.5*	179.0**	140.5	200.5**	127.0	211.5*	108.0	120.0*
100.00	229.5**	276.0**	234.5**	236.5**	160.0	221.0**	158.5**	169.0**	134.0*	110.0
200.00	301.0**	345.0**	270.0**	265.5**	242.0**	235.0**	175.5*	172.5**	125.0	117.5**
Potency	1,200 (1,000 - 1,300)	1,900 (1,700 - 2,100)	740 (500 - 900)	1,200 (1,000 - 1,300)	380 (200 - 500)	2000 (400 - 1,400)	390 (300 - 400)	5,000 (4,100 - 5,900)	190 (100 - 200)	170 (100 - 200)
Classification	moderate	moderate	low	moderate	low	moderate	low	moderate	low	low

Site 3 (Queiroz River)											
Doses mg/plate	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
0.00	107.6	90.8	137.6	114.4	137.6	114.4	NP	NP	95.4	85.6	
6.25	119.0	103.5	152.5	114.5	143.0	-			-	-	
10.0	-	-	-	-	-	-			95.5	91.5	
12.50	133.5	134.5*	146.0	130.0	142.0	116.5			-	-	
25.00	158.0**	144.0**	147.5	-	158.0	-			99.0	74.0	
50.00	170.5**	178.5**	163.5	-	176.0*	154.0*8			92.0	98.5	
100.00	188.0**	180.0**	192.5	196.5**	256.5**	215.5**			109.5*	124.5	
200.00	218.0**	217.0**	228.0	239.0	400.5**	309.5**	Negative (c)		99.0	122.0*	
Potency	1,400 (1,100 - 1,600)	1,900 (1,500 - 2,100)	470 (300 - 600)	700 (600 - 700)	1,200 (1000 - 1,400)	990 (900 - 1,000)			Negative		
Classification	moderate	moderate	low	low	moderate	low					

Table 3: Potencies of the Benzo(a)pyrene and 2-Aminoanthracene in revertants per μg for the Salmonella strain YG1041 in the Salmonella/microsome microsuspension assay in the presence and absence of S9 mix.

Doses (μg)	Benzo(a)pyrene		Doses (μg)	2-Aminoanthracene	
	-S9	+S9		-S9	+S9
0.000	95.6	74.2	0.0000	95.6	74.2
0.025	96.0	84.0	0.0025	84.0	115.0**
0.050	87.0	96.5	0.0050	97.0	154.5**
0.100	100.0	136.5*	0.0100	113.0	212.5**
0.250	94.5	161.0**	0.0250	127.0*	745.5**
0.500	75.0	233.0**	0.0500	176.0**	1458.5**
1,000	113.0	286.5**	0.1000	257.0**	1400.0**
2,500	93.5	341.5**	0.2500	410.0**	792.0**
5,000	92.5	347.5**	0.5000	633.5**	614.5**
-	-	-	1,0000	1036.0**	325.0**
Potency (rev./μg)	ND	340	Potency (rev./μg)	1,400	14,000

ND: Not Detected

(*): Significant at 5% (ANOVA)

(**): Significant at 1% (ANOVA)

Figure 1: Sampling sites located in the Santos Estuary.

Figure 2: Blue Rayon anchored apparatus.