 BIBLIOTECA
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


**ESTRATÉGIAS PARA AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE
SEDIMENTOS**

Deborah Arnsdorff Roubicek

Tese para obtenção do título
de DOUTOR

Orientadora:
Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro

São Paulo
2003

 **BIBLIOTECA**
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

**ESTRATÉGIAS PARA AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE
SEDIMENTOS**

Deborah Arnsdorff Roubicek

Tese para obtenção do título
de DOUTOR

Orientadora:
Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro

São Paulo
2003

17.622

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005470

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

Roubicek, Deborah Arnsdorff
R853e Estratégias para avaliação da genotoxicidade de sedimentos /
Deborah Arnsdorff Roubicek. -- São Paulo, 2003.
125p.

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

Orientador: Umbuzeiro, Gisela de Aragão

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

615.9 CDD

Deborah Arnsdorff Roubicek

Estratégias para avaliação da genotoxicidade de sedimentos

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro
orientador/presidente

Dra. Maria Inês Zanoli Sato

Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva

Dra. Elisabeth Souza Nascimento

Prof. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros

São Paulo, 8 de julho de 2003

**aos meus queridos filhos e sobrinhos
grandes observadores, pequenos cientistas**

**Luisa e Marcelo
Daniel e Bruno
Sylvia Ellen**

Ao Rafi

AGRADECIMENTOS

À Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro, orientadora, chefe e amiga, por essas três coisas e outras mais.

À Dra. Maria Inês Zanoli Sato, pela amizade, compreensão e paciência.

À Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB - na figura do Departamento de Análises Ambientais, por todos os recursos colocados à minha disposição e pelo incentivo ao meu aprimoramento profissional.

À toda equipe do Setor de Mutagênese e Citotoxicidade, funcionários e estagiários, colegas queridos, que tanto ajudaram neste trabalho, por todo apoio que me vem sendo dado, especialmente neste último ano. O meu agradecimento sincero.

Aos meus amigos e colegas da CETESB, que tanto contribuíram para a realização deste e de outros trabalhos, sem sequer sabê-lo!

Aos meus amigos Célia, Paulo, Carlos e Nancy, agradeço a confiança, o apoio, a amizade e a alegria dos últimos muitos anos.

Ao Fabio e à Dani, amigos de pós-graduação e de trabalho, obrigada pela força, pelas dicas, pelos livros da biblioteca e pelo carinho. E ainda pelo esforço final!

À Valéria Prósperi, companheira de 'assunto', pela ajuda e atenção, e um agradecimento especial ao amigo Geraldo Eisyunki, que sonhou com tudo desde o início.

À Marta Lamparelli e ao José Eduardo Bevilacqua que muito contribuíram para o aumento do meu conhecimento, por todas as oportunidades que me deram.

A Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros, cara “desorientadora”, pela atenção, por ter quebrado todos os meus galhos burocráticos e pela amizade. Que seja o início de muitos trabalhos conjuntos.

À Tânia Sawada, agradeço a paciência e companheirismo. Ao pessoal do laboratório da Profa. Silvia e aos colegas da pós-graduação, que sempre me receberam tão bem.

À Márcia, secretária do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela atenção dispensada e aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação, Jorge, Elaine e Benê, que tiveram tanta paciência.

À Giovana pelo auxílio em muitas partes deste manuscrito. Quanta tabela!

À Tata, à Dani e ao Marquinho, estagiários que trabalharam neste projeto e que tanta alegria trouxeram ao laboratório.

Ao Zé Augusto e à Diane, amigos de todas as jornadas, pelo apoio total e incentivo permanente, em quaisquer projetos e idéias.

Ao Rafi, que além de aturar o mestrado, teve que agüentar o doutorado. Nosso projeto de vida continua maravilhoso, muito mais do que eu jamais sonhei construir. *Here, there, and everywhere...*

Aos meus companheiros de lição de casa, meus filhos Luisa e Marcelo, que souberam deixar a mamãe trabalhar e, à sua maneira, me deram todo apoio, mesmo quando a lição deles acabava e a minha não. *All my loving.*

À toda minha família, sem a qual eu não teria chegado onde cheguei. O meu sincero e profundo agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1.
2. OBJETIVOS	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. MÉTODOS COMUNS ÀS ETAPAS DO ESTUDO.....	27
4.1.1. Coleta de Sedimentos.....	27
4.1.2. Teste de Genotoxicidade – Teste de Ames.....	27
4.1.2.1. Linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>	30
4.1.2.2. Verificação das características genéticas das linhagens – Placa Master.....	30
4.1.2.3. Expressão e interpretação de resultados de teste de Ames.....	32
4.1.2.4. Meios de Cultura e Soluções.....	33
4.2. ETAPA I – PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS.....	39
4.2.1. Sedimentos de Pirapora do Bom Jesus.....	40
4.2.1.1. Extração orgânica das amostras de Pirapora do Bom Jesus – Extratos Brutos.....	40
4.2.1.2. Extração orgânica das amostras de Pirapora do Bom Jesus – Fracionamentos.....	40
4.2.1.3. Análise de genotoxicidade das amostras de Pirapora do Bom Jesus...41	
4.2.2. Sedimento de Cubatão.....	42
4.2.2.1. Extração Orgânica – amostra do Ponto C de Cubatão.....	42
4.2.2.2. Análise de genotoxicidade da amostra do Ponto C de Cubatão.....	42
4.2.3. Comparação de Métodos.....	42
4.2.3.1. Locais de Coleta	42

4.2.3.2. Comparação de métodos: diferentes solventes utilizados na extração orgânica das amostras de sedimento.....	44
4.2.3.3. Comparação de métodos: teste de Ames com e sem pré-incubação.....	45
4.2.3.4. Comparação de métodos: preparo de amostra de sedimento.....	45
4.3. ETAPA II – AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE SEDIMENTOS DA BAIXADA SANTISTA – APLICAÇÃO DOS MÉTODOS ESCOLHIDOS.....	47
4.3.1. Locais de Coleta.....	47
4.3.2. Avaliação da genotoxicidade dos sedimentos da Baixada Santista.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1. ETAPA I – PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS.....	49
5.1.1. Pirapora do Bom Jesus.....	49
5.1.2. Cubatão / Baixada Santista.....	55
5.1.2.1. Avaliação de solventes para extração orgânica.....	56
5.1.2.2. Avaliação de metodologias de Teste de Ames.....	61
5.1.2.3. Avaliação de procedimentos de preparo de amostra.....	65
5.2. ETAPA II – GENOTOXICIDADE DE SEDIMENTOS DA BAIXADA SANTISTA.....	97
6. CONCLUSÕES	108
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
CURRICULUM VITAE	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática das etapas deste estudo

Figura 2 – Draga de Van Veen

Figura 3 – Esquema da realização de teste de Ames, incorporação em placas (Maron & Ames, 1983 e CETESB, 1993) e com pré-incubação

Figura 4 – Fotografias do reservatório de Pirapora do Bom Jesus, onde se verifica a formação de espuma superficial

Figura 5 – Localização dos pontos de coleta: Ponto 1: Ponto C, Ponto 2: Rio Piaçaguera, Ponto 3: Rio Queiroz

Figura 6 – Fotografia da coleta no Ponto C

Figura 7 – Fotografia do Rio Piaçaguera no ponto de coleta

Figura 8 – Locais de amostragem do monitoramento da Baixada Santista (Pto 1 - R. Cubatão – barragem, Pto 2 - R. Perequê, Pto 3 - R. Cubatão - Pte Ferro, Pto 4 - R. Piaçaguera, Pto 5a, 5b, 5c – Bacia de Evolução COSIPA, Pto 10 - R. Casqueiro, Pto 12 - R. Santana, Pto 14 - R. Mariana, Pto 18 - Baía de Santos)

Figura 9 – Retas de regressão comparando os solventes utilizados na extração orgânica dos sedimentos coletados no Ponto C e no Rio Piaçaguera

Figura 10 - Retas de regressão comparando as metodologias de teste de Ames: Incorporação em Placas e Pré-Incubação

Figura 11 – Reta de regressão comparando as metodologias de extração orgânica dos sedimentos: *in natura* e *seco*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características genéticas das linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas nos ensaios de genotoxicidade e taxa de mutação espontânea esperada por placa

Tabela 2 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento BJ1, frente às linhagens TA98, TA100, TA104 e TA1537 de *S.typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Tabela 3 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento BJ2, frente às linhagens TA98, TA100, TA104 e TA1537 de *S.typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Tabela 4 – Resultados dos testes de Ames para as frações do extrato orgânico da amostra de sedimento BJ1, frente as linhagens TA98, TA100, TA104 e TA1537 de *S.typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Tabela 5 – Resultados dos testes de Ames para as frações do extrato orgânico da amostra de sedimento BJ2, frente às linhagens TA98, TA100, TA104 e TA1537 de *S.typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Tabela 6 – Resultados dos testes de Ames para os brancos do extrato bruto (Br) e frações, frente às linhagens TA98, TA100, TA102 e TA1537 de *S.typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Tabela 7 - Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no ponto de descargas de efluente da COSIPA, em Cubatão, frente as linhagens TA98, TA1538, TA100 e TA1535 de *S.typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Tabela 8 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Ponto C (1a. campanha), extraído com DCM/metanol e com DCM/acetona, frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Tabela 9 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Rio Piaçaguera (1a. campanha), extraído com DCM/metanol e DCM/acetona, frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Tabela 10 - Resultados dos testes de Ames, Incorporação em Placas e Pré-Incubação, para o sedimento coletado no Ponto C (1a. campanha), extraído com DCM/metanol, frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Tabela 11 – Resultados dos testes de Ames, Incorporação em Placas e Pré-Incubação, para o sedimento coletado no Rio Piaçaguera (1a. campanha), extraído com DCM/metanol, frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Tabela 12 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Ponto C (2a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído *in natura*

Tabela 13 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Ponto C (2a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído seco

Tabela 14 – Resultados dos testes de Ames do extrato do “pellet” resultante da centrifugação do sedimento coletado no Ponto C (2a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Tabela 15 – Resultados dos testes de Ames do extrato da água intersticial do sedimento coletado no Ponto C (2a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Tabela 16 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Rio Piaçaguera (2a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído *in natura*

Tabela 17 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Rio Piaçaguera (2a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído seco

Tabela 18 – Resultados dos testes de Ames do extrato do pellet resultante da centrifugação do sedimento coletado no Rio Piaçaguera (2a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Tabela 19 – Resultados dos testes de Ames do extrato da água intersticial do sedimento coletado no Rio Piaçaguera (2a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Tabela 20 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Ponto C (3a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído *in natura*

Tabela 21 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Ponto C (3a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído seco

Tabela 22 – Resultados dos testes de Ames do extrato do pellet resultante da centrifugação do sedimento coletado no Ponto C (3a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Tabela 23 – Resultados dos testes de Ames do extrato da água intersticial do sedimento coletado no Ponto C (3a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Tabela 24 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Rio Piaçaguera (3a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído *in natura*

Tabela 25 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Rio Piaçaguera (3a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído seco

Tabela 26 – Resultados dos testes de Ames do extrato do pellet resultante da centrifugação do sedimento coletado no Rio Piaçaguera (3a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Tabela 27 – Resultados dos testes de Ames do extrato da água intersticial do sedimento coletado no Rio Piaçaguera (3a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Tabela 28 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Rio Queiroz (3a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído *in natura*

Tabela 29 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Ponto C (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído *in natura*

Tabela 30 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Ponto C (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído seco

Tabela 31 – Resultados dos testes de Ames do extrato do pellet resultante da centrifugação do sedimento coletado no Ponto C (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* na presença e na ausência de S9

Tabela 32 – Resultados dos testes de Ames do extrato da água intersticial do sedimento coletado no Ponto C (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* na presença e na ausência de S9

Tabela 33 – Resultados dos testes de Ames) para o sedimento coletado no Rio Piaçaguera (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído *in natura*

Tabela 34 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Rio Piaçaguera (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído seco

Tabela 35 – Resultados dos testes de Ames do extrato do pellet resultante da centrifugação do sedimento coletado no Rio Piaçaguera (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* na presença e na ausência de S9

Tabela 36– Resultados dos testes de Ames do extrato da água intersticial do sedimento coletado no Rio Piaçaguera (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* na presença e na ausência de S9

Tabela 37 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Rio Queiroz (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído *in natura*

Tabela 38 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Rio Queiroz (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído seco

Tabela 39 – Potência das amostras de sedimento, em número de revertentes por grama equivalente de sedimento, coletadas no Ponto C e no Rio Piaçaguera, nas diferentes campanhas de amostragem, preparadas para extração de maneiras diversas

Tabela 40 – Resultados de teste de Ames dos extratos de sedimento coletados nos diferentes locais da Baixada Santista, frente às linhagens TA98 e TA100, na presença e na ausência de S9

Tabela 41 – Principais fontes de poluição e contaminantes encontrados nos sedimentos da Baixada Santista estudados (adaptado de CETESB, 2001), resultados qualitativos da atividade genotóxica destas amostras (este estudo) e de toxicidade crônica com o ouriço marinho *Lytechinus variegatus* (adaptado de Prósperi, 2002).

Tabela 42 – Concentrações de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, expressos em $\mu\text{g/Kg}$ de sedimento seco, determinadas nas amostras de sedimento coletadas na Baixada Santista (modificado de Prósperi, 2001)

RESUMO

A contaminação de ambientes aquáticos por descargas industriais e domésticas tem sido fonte de preocupação há algumas décadas. Muitos dos contaminantes, quando liberados na água, podem ser adsorvidos ou ligar-se ao material particulado e depositar-se no sedimento de fundo destes ambientes. Os sedimentos têm influência direta na qualidade das águas pois são considerados depósito de contaminantes e também fonte de poluição para a coluna d'água.

Os contaminantes presentes nos sedimentos podem ser avaliados utilizando-se análises químicas ou ensaios ecotoxicológicos. Os compostos orgânicos com atividade genotóxica, capazes de alterar o material genético de organismos expostos, têm sido usualmente detectados pelo teste de Ames, que avalia a indução de mutações em linhagens de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para histidina. Para aplicação desta metodologia, uma etapa de extração química das amostras de sedimento é necessária.

Este trabalho teve por objetivo comparar diferentes metodologias de preparo de amostra, extração orgânica e condições do teste de Ames para desenvolver uma estratégia para caracterização e monitoramento da qualidade de sedimentos.

A extração com diclorometano/metanol da amostra de sedimento previamente seca e a utilização do teste de Ames por incorporação em placas, com as linhagens TA98 e TA100 na presença e ausência de S9, mostrou-se como metodologia apropriada para um estudo de triagem inicial. O fracionamento de extratos e o uso de linhagens adicionais de *S.typhimurium* podem ser ferramentas importantes para a confirmação de resultados negativos.

Esta estratégia metodológica foi utilizada na avaliação da genotoxicidade de sedimentos da Baixada Santista indicando locais prioritários para estudo e confirmando o alto grau de contaminação por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos de algumas regiões do estuário.

ABSTRACT

The contamination of aquatic ecosystems by industrial and domestic discharges has been of great concern in the last decades. When released into the aquatic environment, many contaminants tend to bind or adsorb onto particulate matter and settle on the bottom sediments. Sediments are considered to be sink and source of contaminants, affecting directly the water quality.

Chemical analyses and ecotoxicity assays can be used in the evaluation of sediment pollutants. Genotoxicants, that damage the DNA of exposed organisms, are usually detected by the Ames Salmonella mutagenicity test.

The aim of this study was to standardize methodologies to assess the genotoxicity of sediments, and find strategies that could be used to characterize and monitor the quality of those environmental samples.

We concluded that dried sediment samples extracted with methylene chloride/methanol, and tested with TA98 and TA100 *Salmonella* strains, with and without S9, with the standard plate incorporation Ames test were appropriate to screening studies. Fractionation of the extracts and the use of other *Salmonella* strains showed be useful tools in the confirmation of negative results.

This strategy was used to evaluate the genotoxicity of sediments from the Baixada Santista region. The results obtained indicated an area with high mutagenic activity, known to be highly contaminated with PAHs. Other two areas showed positive results, and further studies are necessary to identify the contaminants responsible for this activity.

1. INTRODUÇÃO

SEDIMENTOS

A contaminação de ambientes aquáticos por descargas industriais e domésticas tem sido fonte de preocupação há algumas décadas. Muitos dos contaminantes, quando liberados na água, podem ser adsorvidos ou ligar-se ao material particulado e, dependendo das condições morfológicas e hidrológicas do corpo d'água, depositam-se e podem se tornar parte do sedimento de fundo destes ambientes (Viganò *et al*, 2003).

Sedimentos compreendem todos os detritos, partículas orgânicas e inorgânicas que se depositam no fundo de um corpo d'água. Trata-se de uma matriz complexa que pode ser bastante heterogênea em termos de características físicas, químicas e biológicas (Power & Chapman, 1992).

Pode-se considerar que os sedimentos são constituídos de quatro principais componentes: a água intersticial, que preenche os espaços entre as partículas e geralmente ocupa o maior volume (podendo chegar a mais de 50% do volume total); a fase inorgânica, com fragmentos de rochas, conchas e grãos minerais, resultantes dos processos de erosão de materiais terrestres; a fase orgânica, que usualmente ocupa um pequeno volume, mas é de importância crucial, já que pode regular a adsorção e biodisponibilidade de muitos contaminantes e, finalmente, materiais derivados de atividade antropogênica, incluindo os contaminantes e erosão do solo (Power & Chapman, 1992).

Compostos químicos hidrofóbicos que entram no ambiente aquático associam-se rapidamente às partículas suspensas e com os sedimentos. A natureza das interações entre os compostos hidrofóbicos e as partículas de sedimento tem sido correlacionada com a quantidade de carbono orgânico desta matriz, tipo e quantidade de argila, capacidade de troca iônica e pH (Knezovich *et al*, 1987).

Os organismos bentônicos, que no sedimento vivem e dele se alimentam, são marcadores importantes da sua qualidade e da disponibilidade dos contaminantes. Estes organismos completam grande parte ou todo seu ciclo de vida nos sedimentos e refletem a qualidade deste ambiente, espacial e temporariamente (LaPoint & Fairchild, 1992; Swift *et al*, 1996). Estas comunidades podem ser alteradas na sua quantidade e qualidade, dependendo dos níveis de contaminação dos sedimentos. Mais ainda, os contaminantes podem se bioacumular nestes organismos e a predação por peixes ou invertebrados faz com que eles sejam introduzidos e biomagnificados ao longo das cadeias tróficas (Lee II, 1992; Lamoureux & Brownawell, 1999).

Os sedimentos não são estáticos, podendo ser ressuspensos por movimentos da água, decorrentes, por exemplo, de uma tempestade ou da propulsão de um motor de barco. Isto implica na exposição direta de outros organismos da coluna d'água, não somente os que vivem diretamente em contato com os sedimentos, a substâncias tóxicas (USEPA, 2002). Procedimentos de dragagem para aprofundamento de rios e áreas portuárias também afetam em grande proporção a dinâmica desta matriz.

Os sedimentos têm, portanto, influência direta na qualidade das águas na medida em que neles há um reprocessamento de materiais, havendo liberação ou não de contaminantes, nutrientes e outros compostos para a coluna d'água. Desta forma, os sedimentos são considerados depósito de contaminantes antropogênicos e também fonte de poluição para os organismos de fundo e para a coluna d'água (Burgess & Scott, 1992).

A avaliação da qualidade dos sedimentos pode ser realizada de maneiras tão diversas quanto a complexidade desta matriz, e todas contribuem significativamente para o conhecimento que leva a tomada de decisão para controle, manejo e remediação destes ambientes contaminados. Esta avaliação pode abranger análises químicas, físico-químicas e biológicas e a integração destas informações fornece subsídios para o desenvolvimento de critérios de qualidade.

Em geral, agências reguladoras utilizam critérios numéricos que consideram, basicamente análises químicas na avaliação da qualidade de sedimentos. No entanto,

a quantidade de novas substâncias que são lançadas anualmente no ambiente, os custos envolvidos em analisá-las individualmente e o fato de que elas raramente afetariam os organismos como compostos individuais, são fatores que devem ser considerados (Ahlf *et al*, 2002).

Alguns critérios de qualidade foram desenvolvidos, objetivando, principalmente, dar subsídios para o manejo apropriado de sedimentos que necessitam ser retirados dos canais de navegação e/ou áreas portuárias através de procedimentos de dragagem. No Estado de São Paulo, o órgão ambiental estadual (CETESB) tem usado como base para estudos de caracterização de áreas contaminadas e avaliação das possibilidades de disposição de sedimentos dragados, o critério adotado pela agência ambiental canadense (Environment Canada, 2002). Neste são apresentados critérios numéricos para substâncias químicas, na forma de três valores distintos de acordo com o seu impacto potencial, que foram desenvolvidos levando-se em consideração avaliações ecotoxicológicas, de forma a proteger os organismos bentônicos (Prósperi & Roubicek, 2002).

ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE

Historicamente, a descoberta feita por Auerbach, em 1941, de que o gás mostarda provocava mutações em *Drosophila melanogaster* foi a primeira demonstração de mutagênese química induzida (Auerbach, 1973). Apesar da implicação desta descoberta na área da saúde humana, a maioria dos geneticistas entre 1940 e 1950 estava interessada em usar os mutágenos químicos como ferramenta para entender melhor os processos genéticos e celulares.

A preocupação com a exposição humana aos mutágenos químicos somente se iniciou nos anos de 1960, devido ao avanço industrial pós-guerra, que fez com que houvesse a necessidade de se controlar a grande quantidade de produtos lançados no ambiente. Inicialmente, foi dada maior atenção ao efeito das mutações nas células germinativas, capazes de causar doenças hereditárias. Nessa época, vários ensaios de mutagenicidade *in vivo* foram desenvolvidos. Porém, apesar da teoria da mutação somática do câncer ter sido formulada no início do século, não havia experimentos que

associavam definitivamente mutágenos químicos ao processo de carcinogênese.

Compostos genotóxicos são aqueles que reagem com a molécula do DNA, diretamente ou após biotransformação, produzindo alterações, que se perpetuadas nas células filhas, são denominadas mutações. Nem todos os carcinógenos são, no entanto, genotóxicos, podendo haver compostos que têm a capacidade de aumentar a eficiência de um agente genotóxico, sem reagir com o DNA (Weisburger, 1999). As microcistinas, por exemplo, são toxinas de algas que possuem atividade promotora de tumores, mas não são genotóxicas (Azevedo, 2002).

As mutações são a fonte de variabilidade genética de uma população, sendo, desta forma, fundamentais para a manutenção das espécies. Porém, podem causar doenças tanto nos indivíduos como nos seus descendentes e, dependendo da quantidade, do tipo e local onde ocorrem, alterar o balanço dos ecossistemas (Brusick, 1992). Os compostos mutagênicos encontram-se distribuídos nos ecossistemas (água, solo, ar); são transferidos e acumulados através das cadeias tróficas, podendo causar danos genéticos ou efeitos genotóxicos nos indivíduos ou populações expostas (Würgler & Kramers, 1992; Bickham *et al*, 2000).

Os ensaios de curta duração foram, em geral, desenvolvidos com o objetivo de identificar compostos químicos que poderiam danificar o DNA celular ou causar mutações e secundariamente, para identificar possíveis carcinógenos. A teoria somática da carcinogênese dizia que mutações seriam uma primeira etapa comum no desenvolvimento de uma célula cancerígena, conseqüentemente fomentou-se o interesse nestes testes pela sua habilidade de identificar carcinógenos potenciais (Fetterman *et al*, 1997).

A informação de que somente uma pequena parte dos compostos químicos produzidos pelo homem foram avaliados adequadamente quanto a sua genotoxicidade (Brusick *et al*, 1992) e a diversidade de misturas complexas que podem ser formadas quando esses compostos são lançados no meio ambiente, nos leva a refletir sobre a grande importância da existência de metodologias rápidas e eficientes para testá-los. Existem mais de 200 diferentes testes genéticos de curta duração que utilizam bactérias,

fungos, células em cultura, plantas, insetos e vários outros animais. Eles avaliam os mais diversos 'endpoints' como danos ao DNA, mutações gênicas, aberrações cromossômicas, micronúcleos, trocas entre cromátides irmãs, aneuploidias e transformação celular. O tipo de lesão é importante na medida em que pode fornecer informações sobre a natureza do composto estudado (Houk, 1996).

A maioria dos testes, no entanto, possui limitações, que precisam ser levadas em consideração ao se escolher o ensaio para resolver determinada questão. A seleção e performance de testes apropriados para avaliação dos riscos associados à exposição humana, ou de qualquer outra população, dependem de conhecimento e experiência científica (USEPA, 1986).

Teste de Ames

Nos anos de 1970, o Dr. Bruce Ames e colaboradores da Universidade de Berkeley, Califórnia (Ames *et al*, 1973, 1975) desenvolveram um teste *in vitro*, de curta duração, que combinado a um sistema de metabolização *in vitro*, mostrou uma alta correlação entre vários mutágenos e carcinógenos conhecidos (McCann *et al* 1975; Commoner *et al.*, 1978; Sugimura *et al*, 1976, Purchase *et al*, 1978; Simmon, 1979). Este ensaio é conhecido hoje como teste de Ames e é considerado um marco na história da Genética Toxicológica.

O teste de Ames é o ensaio mais utilizado atualmente e o único validado em larga escala por diversos laboratórios. O teste emprega linhagens de *Salmonella typhimurium* derivadas da linhagem parental LT2, auxotróficas para histidina (*his*⁻), especialmente construídas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de bases no DNA. Essas linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem a síntese deste aminoácido (Maron & Ames, 1983).

A taxa de mutação reversa é facilmente medida pela contagem do número de colônias que crescem em meio mínimo após a exposição de uma população de células a um agente mutagênico. O teste é realizado com e sem ativação metabólica.

A maior parte dos contaminantes ambientais, incluindo os mutagênicos e carcinogênicos, não reage diretamente com o DNA. Estes necessitam ser metabolizados para que seus derivados apresentem atividade mutagênica, e são chamados de pró-mutágenos ou mutágenos indiretos (é o caso das aminas aromáticas, dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aflatoxina, nitrosaminas e outros) (Josephy *et al*, 1997). Nestes casos, os ensaios, sejam eles com microrganismos ou com células eucarióticas, devem incluir um sistema de ativação metabólica. O sistema mais comumente utilizado, desenvolvido por Mallin (1971), é a fração microsomal-S9, que é composta de um homogenado de células de fígado de rato tratado com Aroclor 1254, que induz um aumento das enzimas do sistema P-450 neste órgão, especialmente as isoformas do grupo CYP1A1. A fração S9 é acrescida de cofatores e necessita de condições de pH específicas para que as reações de metabolização possam ocorrer (Kranendonk, 2000).

As diversas linhagens de *S.typhimurium* desenvolvidas pelo Dr. Ames possuem mutações para histidina em diferentes genes do operon responsável pela biossíntese deste aminoácido. Apresentam também outras características genéticas que lhes conferem maior sensibilidade e versatilidade na detecção de diversos tipos de mutágenos, como a mutação *rfa* que causa perda parcial da barreira de lipossacárides da parede bacteriana, facilitando a entrada de moléculas grandes na célula, a deleção do gene *uvrB*, que faz parte do sistema de reparo de excisão, impedindo o seu funcionamento e a presença do plasmídeo pKM101, marcado com o gene de resistência à ampicilina e contendo o gene *muc*, responsável pelo aumento do sistema de reparo passível de erro, aumentando consequentemente a mutagênese.

As linhagens mais comumente utilizadas pela maioria dos autores são a TA98 e a TA100, principalmente em estudos de triagem, pois elas têm se mostrado eficientes na detecção de um grande número de mutágenos (Mortelmans & Zeiger, 2000; Umbuzeiro *et al*, 2001).

Watanabe *et al*. (1989, 1990) e Hagiwara *et al* (1993) desenvolveram novas linhagens para a detecção de nitro-compostos a partir das cepas TA98 e TA100

(YG1020, YG1021, YG1024, YG1025, YG1026, YG1029, YG1041, YG1042) que contêm plasmídios com os genes da nitroreductase e acetiltransferase, intensificando a metabolização destes compostos e elevando sua resposta mutagênica em relação à linhagem parental.

Muito se debateu nos últimos trinta anos sobre a correlação entre mutagenicidade e carcinogenicidade. Na década de 1970, reforçada pelos estudos de Ames, esta forte associação era considerada premissa fundamental. Nos anos de 1980, a força desta correlação diminuiu, indicando que os ensaios de curta duração poderiam não detectar todos os carcinógenos, o que levou à criação do termo "carcinógeno não genotóxico" (Auletta & Ashby, 1988). O que se sabe hoje é que a maioria dos compostos carcinogênicos humanos, com exceção de alguns hormônios e agentes imunossupressores, tem demonstrado atividade mutagênica em animais ou células somáticas humanas (Waters et al, 1999).

No que diz respeito ao teste com Salmonella, o teste de Ames, diversos trabalhos têm sido publicados com comparações que visam estabelecer a sua real capacidade de prever carcinogênese. Os primeiros estudos diziam haver aproximadamente 90-95% de pressuposição de câncer dos resultados de Salmonella, e cerca de 90% de concordância entre estes resultados e ensaios de carcinogênese em roedores. Posteriormente, um trabalho realizado pelo U.S. National Toxicology Program – NTP - demonstrou uma faixa mais ampla na capacidade de prever a carcinogenicidade (69-100%) e menores concordâncias com outros testes, 61 a 66% (Fetterman et al, 1997). A comparação de resultados de estudos tabulados recentemente pelo NTP entre ensaios de genotoxicidade (Salmonella) e carcinogenicidade (estudo de dois anos em roedores), mostra que dos 443 compostos avaliados, 173 deles apresentam discordância na resposta, apresentando positividade para um e negatividade para outro. Este dado mostra que 61% dos resultados são concordantes. A comparação entre ensaio de micronúcleo em linfócito de sangue periférico e os mesmos ensaios de carcinogenicidade foi feita para 92 compostos e 59,8% deles apresentaram discordância (NTP, 2003). O que se verifica, no entanto, é que o teste de Ames possui grande sensibilidade e pouca especificidade, isto é, pode detectar níveis baixos de alguns agrupamentos químicos e não pode detectar outros, ou muito fracamente.

A aparente concordância ou discordância entre os resultados dos mais diversos estudos, que avaliam 'endpoints' diferentes utilizando vários organismos, deixa claro que a avaliação da atividade genotóxica de um dado composto requer mais de um tipo de ensaio/organismo/'endpoint' e ainda assim, pode não chegar necessariamente a resultados conclusivos. As baterias de testes geralmente incluem o teste de Ames, um teste citogenético *in vitro* e um teste *in vivo* (USEPA, 1986; COM, 2000; Gollapudi & Krishna, 2000).

Na avaliação da qualidade ambiental, no entanto, raramente um efeito observado é devido à ação de um único composto. No ambiente, o que se encontra são misturas complexas, compostas de inúmeras substâncias que podem ou não interagir entre si, podendo modificar as respostas esperadas para cada uma das substâncias isoladamente, se fosse possível identificá-las. Desta forma, ao testar a genotoxicidade presente em amostras ambientais, o que se observa é o efeito daquela mistura como um todo.

Como o teste de Ames é o ensaio mais utilizado para avaliação da genotoxicidade de misturas complexas (Houk, 1992; Claxton *et al*, 1998), existe uma vasta base de dados, que nos permite comparar a contribuição de fontes específicas para a genotoxicidade de uma dada mistura. Este ensaio é também sempre empregado como teste preliminar em baterias de testes durante o desenvolvimento de novos fármacos (Fetterman *et al*, 1997), principalmente por se tratar de um teste relativamente simples, de baixo custo e de grande reprodutibilidade.

O teste de Ames foi proposto desde a 18ª. edição do Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 1992) para avaliação da atividade mutagênica presente em amostras líquidas. Também é obrigatório para obtenção de licença de funcionamento de indústrias do Estado de New Jersey, nos Estados Unidos.

Em 1998, a Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo propôs, através da Resolução SMA65/98, a inclusão do teste de Ames para avaliação do potencial mutagênico de águas cujo destino final, após tratamento, seja o consumo humano

(Umbuzeiro *et al*, 2001) e já está sendo utilizado pela CETESB como parâmetro de cálculo do Índice de Qualidade das Águas para Abastecimento Público (IAP).

O teste de Ames tem sido utilizado no Estado de São Paulo também em estudos para o controle e avaliação de processos de tratamento de água de abastecimento público (Sanchez, *et al*, 1992; Stoppe, *et al*, 1998; Roubicek *et al*, 2002), avaliação da toxicidade de efluentes industriais e da eficiência dos processos de tratamento de efluentes industriais e resíduos sólidos, na remoção destes compostos (Coelho, *et al*, 1992; Murakami, *et al*, 1998) e na caracterização de poluentes genotóxicos, tanto em programas de monitoramento da qualidade das águas e do ar, como em estudos de impacto ambiental e proteção de ecossistemas, visando a tomada de medidas corretivas e preventivas (Valent, *et al*, 1993; Sato, *et al*, 1995; Roubicek, *et al*, 1998, Umbuzeiro *et al*, 2001; Almeida *et al*, 2002). Esta variedade de estudos forma uma base local de dados, bastante significativa para o acompanhamento das ações ambientais tomadas e para o embasamento de atitudes futuras.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo padronizar metodologias de análise e verificar estratégias para avaliação da genotoxicidade de sedimentos que possam ser utilizadas em estudos de caracterização e monitoramento de áreas contaminadas.

Duas etapas distintas foram realizadas:

1. Avaliação de diferentes métodos de análise, envolvendo escolha de solventes, preparo de amostras e variações nas condições do teste de mutagenicidade (teste de Ames)
2. Caracterização do potencial genotóxico de sedimentos da região da Baixada Santista para verificar a aplicabilidade dos métodos escolhidos

3 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

GENOTOXICIDADE DE SEDIMENTOS

Dada a importância e a complexidade da matriz sedimento, no que se refere à caracterização de seu potencial genotóxico, verifica-se na literatura uma grande quantidade de trabalhos que envolvem a definição, padronização e validação de metodologias. Geralmente, grupos de pesquisa desenvolvem metodologia apropriada à avaliação de amostras de determinada região de interesse e a aplicam na caracterização da genotoxicidade do local. O teste de Ames é utilizado na maior parte dos artigos, como estratégia única ou acoplada a análises químicas, ou ainda em conjunto com outro ensaio de mutagenicidade. Via de regra, o teste de Ames serve de referência metodológica, especialmente quando um novo ensaio é proposto ou validado.

Suzuki *et al* (1982) estudaram a mutagenicidade de duas amostras de sedimento coletadas no rio Tama, no Japão, uma delas em uma área urbana com grande concentração de indústrias e outra em área mais preservada, onde a população era menor e não havia influência de descartes industriais. As amostras foram secas e extraídas em aparelho de Soxhlet, os extratos fracionados em coluna cromatográfica com sílica gel e submetidos a cromatografia de camada delgada. Paralelamente, os extratos foram testados quanto ao seu potencial mutagênico, usando-se o teste de Ames com as linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium*, apenas na presença de mistura S9. Os autores verificaram que o extrato obtido inicialmente com n-hexano apresentava alta toxicidade para as linhagens, atribuída ao enxofre presente nas amostras. Atividade mutagênica foi encontrada na maioria das frações, especialmente com a linhagem TA98 e principalmente nos extratos obtidos dos sedimentos da parte do rio que sofria influência urbana e industrial. No entanto, o perfil de mutagenicidade encontrado indicou que a atividade mutagênica encontrada estaria associada a compostos mutagênicos polares e não aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Amostras de sedimento do mesmo rio, da região mais urbanizada e industrializada, foram estudadas por Oishi & Takahashi (1987). Os sedimentos foram liofilizados e extraídos com n-hexano e não foram fracionados. Os extratos foram

testados com as linhagens TA1535, TA1537 e TA1538 de *Salmonella typhimurium*, com e sem S9, e os autores utilizaram o método do teste de Ames com pré-incubação de 20 minutos a 37°C. Foi observada atividade mutagênica preferencialmente com o uso de S9 em todos os locais amostrados, especialmente em uma região localizada em uma zona bastante industrializada. Neste local foi encontrada a maior concentração de HPAs, 1300ng/g de sedimento seco e concentração de benzo(a)pireno de 200ng/g de sedimento seco. Os autores comentam que a mutagênese observada foi muito menor do que se esperaria para estas quantidades de HPAs.

Sato *et al* (1983) avaliaram os sedimentos do rio Nagara, no Japão, em seis sítios influenciados por efluentes de indústria de papel e celulose, de atividades que utilizam corantes e descartes de origem doméstica. Cada amostra de sedimento foi centrifugada e o material precipitado foi extraído com éter. A avaliação da mutagenicidade foi feita com o uso das linhagens TA98 e TA100 do teste de Ames, com e sem mistura S9. Foi verificada atividade mutagênica com a linhagem TA100+S9, na maioria dos locais amostrados, fraca atividade com a linhagem TA98 e foi observada toxicidade na ausência de metabolização. Os mutágenos identificados quimicamente, principalmente benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno, foram relacionados a locais sob influência de descargas industriais e domésticas.

Samoiloff *et al* (1983) estudaram a combinação bioensaio-fracionamento químico para determinação da toxicidade de sedimentos da bacia do rio Saskatchewan, no Canadá. Estes locais estavam sob a influência de atividades agrícolas, mineração, indústrias petroquímicas, papel e celulose e de núcleos urbanos. As amostras de sedimento foram extraídas com acetona-hexano em aparelho de Soxhlet e posteriormente fracionadas. Foram realizados dois diferentes bioensaios: o teste de Ames com as linhagens TA1535, TA1537, TA1538, TA98 e TA100, na presença e na ausência de ativação metabólica e um ensaio de desenvolvimento utilizando o nemátodo *Panagrellus redivivus* no qual é possível detectar letalidade, alterações no desenvolvimento larval e mutagenicidade. Os dois ensaios forneceram respostas similares no que diz respeito a mutagenicidade e apontaram que a maior parte dos componentes (geno)tóxicos das amostras encontravam-se na fração que representa os compostos solúveis em hexano-diclorometano. Análises químicas preliminares

identificaram cerca de 30 compostos potencialmente tóxicos nos dois locais amostrados, com 5 compostos comuns aos dois sítios: 2-nonenal, 1-hexil-3-metilciclopentano, 1,9-nonanediol, tetradecanal e benzaldeído. Os autores, no entanto, não comentam a toxicidade destes compostos.

West *et al* (1986, 1988) estudaram a genotoxicidade presente em sedimentos coletados no Rio Black, em Ohio, nos Estados Unidos. Os autores descrevem um aumento da incidência de câncer hepático em peixes da região sob influência direta de efluentes de uma coqueria de indústria siderúrgica. As amostras de sedimento foram coletadas perto da saída do efluente e extraídas com benzeno/metanol e posteriormente fracionadas. Foram testados para mutagenicidade as frações e o extrato bruto, utilizando-se o teste de Ames (TA98+S9) e o teste de síntese não programada de DNA em linhagem primária de hepatócitos de rato, que demonstra atividade de síntese de DNA em períodos em que não há duplicação celular, indicando reparo de lesões no material genético. A identificação e quantificação de HPAs foi determinada e os autores concluíram que a maior resposta genotóxica era devida a HPAs alquilados com mais de 3 anéis aromáticos e que outros componentes da mistura, que não HPAs, tinham papel importante na mutagenicidade detectada. A atividade mutagênica esperada para a quantidade de HPAs encontrados, no entanto, foi menor que esperado, e os autores sugeriram interferências com outros compostos. No segundo estudo, os autores mostraram que as concentrações de HPAs individuais podiam chegar a 792µg (fenantreno)/g de sedimento seco e que na segunda fração, obtida com benzeno, encontravam-se a maioria dos HPAs e HPAs heterocíclicos contendo enxofre. O trabalho mostrou uma sensibilidade um pouco maior nos ensaios de síntese não programada de DNA que no teste de Ames.

Fabacher *et al* (1988) estudaram cinco locais em tributários do Lago Michigan, um no Lago Huron e outro no Lago Erie, nos Grandes Lagos americanos e ainda um local no Rio Black, que foi considerado como controle positivo. As amostras de sedimento foram congeladas após a coleta. Após a decantação, a água que cobria a porção sólida da amostra era centrifugada, filtrada e foi considerada fração aquosa, testada diretamente para mutagenicidade. O particulado foi extraído por agitação com benzeno/metanol e depois com diclorometano. Os extratos foram fracionados em

coluna de alumina, com hexano, benzeno e clorofórmio, frações 1,2 e 3, respectivamente. A avaliação da mutagenicidade foi realizada com teste de Ames (TA98 ± S9), síntese não programada de DNA em hepatócitos primários de rato e ensaio de hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT) em células de ovário de hamster chinês (CHO), que é um ensaio que avalia mutações pontuais neste gene. Análises químicas demonstraram a presença de compostos aromáticos policíclicos em quase todos os locais avaliados e, conforme esperado, grande quantidade de HPAs no Rio Black. Os ensaios de mutagenicidade não detectaram atividade mutagênica na ausência de S9 e apenas em dois locais amostrados a fração 2 foi positiva. Os resultados de síntese não programada de DNA apontaram positividade para as frações 2 e 3 de todos os locais, assim como no ensaio de HGPRT. A mutagenicidade encontrada, no entanto, não se correlacionou com a quantidade de HPAs encontrada.

A região dos Grandes Lagos, na fronteira dos Estados Unidos com o Canadá tem sido extensamente estudada, por ser uma área altamente industrializada e bastante contaminada. Extratos de sedimentos do Porto de Hamilton, no Canadá, avaliados por Metcalfe *et al* (1990) apresentaram altas concentrações de bifenilas policloradas e pesticidas organoclorados e grandes quantidades de HPAs. Um extrato do sedimento deste local, obtido após homogeneização com acetona/hexano, foi mutagênico para a linhagem TA100 na presença e na ausência de S9 e apresentou toxicidade para a linhagem TA98, no teste de Ames. Ensaio para avaliação de adutos de DNA em células de camundongo mostraram positividade, embora os adutos não tivessem sido característicos daqueles encontrados quando as células eram tratadas com benzo(a)pireno. Estes autores também observaram carcinomas hepáticos em trutas após tratamento destes animais com sedimentos contaminados do Porto de Hamilton.

Os trabalhos publicados por Maccubin & Ersing (1991) e Maccubin *et al* (1991) avaliaram a genotoxicidade de sedimentos do Rio Grand Calumet, Porto de Indiana e do Rio Detroit, na área dos Grandes Lagos, contaminados com descargas industriais, urbanas e de atividades agrícolas. No primeiro estudo, as amostras de sedimento foram extraídas com álcool isopropílico e depois com diclorometano. A mutagenicidade dos extratos foi avaliada com o teste de Ames, com as linhagens TA98 e TA100, na presença e na ausência de S9. Atividade mutagênica foi principalmente encontrada na

presença de ativação metabólica. Embora tenham encontrado potências médias de 23.500 revertentes por g de sedimento seco, os autores acreditam que estes valores podem estar subestimados, já que não fracionaram os extratos. Os sedimentos do Rio Detroit foram extraídos com diclorometano e a mutagenicidade avaliada pelo teste de Ames. Os resultados deste trabalho indicaram ausência de atividade mutagênica com a linhagem TA98 sem S9 e toxicidade para a mesma em concentrações acima de 200 μ g de amostra equivalente por placa. O potencial mutagênico observado foi menor que o encontrado no Rio Grand Calumet, sendo o maior da ordem de 2600 revertentes por g de sedimento equivalente.

Os sedimentos do Porto de Hamilton foram também estudados por Marvin *et al* (1993) e Balch *et al* (1995). No primeiro estudo, os autores investigaram extensivamente extratos de sedimentos contaminados, com concentrações médias de HPAs de 1000 μ g/g de sedimento seco, utilizando uma metodologia que combinava bioensaios com o fracionamento químico. As amostras foram extraídas com diclorometano seguido de metanol e posteriormente fracionadas em coluna de alumina e eluição seriada com solventes de polaridade crescente. As frações foram avaliadas com as linhagens YG1020 e YG1025, derivadas respectivamente das linhagens TA98 e TA100 de *S.typhimurium*, com atividade aumentada das enzimas nitroredutase e o-acetiltransferase. Um incremento na resposta destas linhagens em relação às suas linhagens parentais indicaria a presença de nitrocompostos ou aminas aromáticas. Os resultados obtidos mostraram que a mutagenicidade observada não estava relacionada a nitro-HPAs e análises químicas apontaram a presença de HPAs de baixo e médio peso molecular.

Balch *et al* (1995) avaliaram a mutagenicidade (teste de Ames) e a carcinogenicidade (trutas) de extratos de amostras de sedimento do mesmo local. Os sedimentos foram extraídos com ultrassonicação usando acetona e em seguida com diclorometano. Após ressuspensão em hexano, os extratos foram fracionados em coluna de alumina, com solventes de polaridade crescente. Análises químicas foram realizadas para detecção de HPAs, qualitativa e quantitativamente. No teste de Ames foram empregadas as linhagens TA98, TA100, YG1020 e YG1024 (com elevada atividade de o-

acetiltransferase). O extrato não fracionado da amostra de sedimento do Porto de Hamilton apresentou HPAs totais em concentração de 137 μ g/g de sedimento seco. Foi observada atividade mutagênica atribuída a amins aromáticas e/ou nitroarenos com a linhagem YG1024. O ensaio de carcinogênese *in vivo* mostrou a formação de tumores hepáticos em animais expostos atribuídos aos HPAs aos nitroarenos/amins aromáticas. O fracionamento, segundo os autores aumentou a detecção de mutagenicidade, porém reduziu a atividade carcinogênica.

Durant *et al* (1992, 1994) estudaram extratos de sedimento da bacia do Rio Aberjona, estado americano de Massachusetts. Este corpo d'água recebeu influência direta de descargas de produção de couro, manufatura de compostos químicos, produtos agrícolas, entre outras. Os autores tinham por objetivo verificar se os sedimentos desta bacia continham compostos com atividade mutagênica no *locus* do gene da timidina quinase em uma linhagem celular de linfoblasto humano, metabolicamente competente. Os pesquisadores também testaram os extratos em um ensaio com *S.typhimurium*, com a linhagem TM677, onde se verifica a mutação direta no *locus* da xantina-guanina fosforibosil transferase. Os sedimentos avaliados foram extraídos em com diclorometano e posteriormente metanol. Foram encontradas respostas positivas em ambos os ensaios, porém com algumas diferenças de sensibilidade entre eles, atribuídas a diferenças nas competências metabólicas dos tipos celulares, gerando metabólitos com atividades distintas. Os autores comentam também a possibilidade de existirem compostos inibidores da mutagenicidade, como substâncias húmicas, que poderiam seletivamente adsorver compostos hidrofóbicos, deixando-os indisponíveis e limitando a ação das enzimas de biotransformação.

Papoulias *et al* (1996) otimizaram as condições do teste de Ames para testar extratos de sedimentos aquáticos e Papoulias & Buckler (1996) empregaram esta metodologia na avaliação da mutagenicidade em 29 locais de três áreas de interesse pertencentes à bacia dos Grandes Lagos. Os extratos foram extraídos com diclorometano e posteriormente purificados, de forma a remover macromoléculas co-extraídas com os compostos de interesse em diclorometano e que poderiam precipitar em dimetilsulfóxido. Diferentes concentrações de S9 foram utilizadas para modular a resposta mutagênica, de forma a contornar efeitos tóxicos dos extratos para as

linhagens de *S.typhimurium*. A metodologia foi testada para avaliar o potencial mutagênico de sedimentos coletados nos rios Buffalo, Saginaw e Porto de Indiana. Em todas as amostras coletadas os autores verificaram citotoxicidade e mutagenicidade para pelo menos uma combinação de diluição, S9 e linhagem bacteriana. Em apenas 6 dos 29 extratos a mutagenicidade pode também ser atribuída a mutágenos diretos pois foram positivos tanto com, como sem S9. A linhagem TA98, na presença de S9, foi capaz de detectar mutagenicidade em 100% das amostras e as linhagens TA100, TA97a e TA102 detectaram 62%, 59% e 28%, respectivamente.

A aplicação do teste de Ames em frações isoladas de extratos de sedimentos marinhos e de rio, coletados nas proximidades da cidade de Barcelona, na Espanha, demonstrou resposta positiva (TA98+S9) entre as frações polares, no estudo realizado por Grifoll *et al* (1990). Análises químicas realizadas mostraram sensibilidade e seletividade na detecção de várias classes de compostos mutagênicos, como por exemplo, nitro-HPAs, azoarenos, aminas aromáticas, entre outros. No entanto, os autores não conseguiram correlacionar a composição química com a atividade mutagênica observada nas frações médio-polares, onde os HPAs genotóxicos foram identificados. Isto foi atribuído a interações antagônicas com outros componentes da mistura. No entanto, segundo os pesquisadores, estas interações são menos aparentes nas frações polares, devido a diferenças na composição lipídica. Eles sugerem que um fracionamento em múltiplas etapas, incluindo uma separação de lipídios dos extratos orgânicos poderia melhorar a avaliação da mutagenicidade de sedimentos aquáticos. Este refinamento metodológico foi utilizado por este grupo de pesquisa na avaliação da mutagenicidade de sedimentos coletados na região costeira de Barcelona (Fernández *et al*, 1992). Neste trabalho, a análise química detalhada das frações dos extratos de sedimento revelou a presença de 57 mutágenos dentre os 140 compostos aromáticos presentes, entre eles 1-nitropireno, 6-nitrocriseno e 6-nitrobenzo(a)pireno, que foram aparentemente detectados pela primeira vez em sedimentos de região costeira.

A interação entre compostos presentes em extratos de sedimentos foi estudada por Abe & Urano (1994). Amostras de sedimentos em áreas contaminadas dos rios Tsurumi e Sagami, no Japão, foram extraídas por sonicação, com diclorometano/etanol, acetonitrila ou etanol. Alguns procedimentos de

purificação/fracionamento foram realizados e a mutagenicidade foi avaliada com a linhagem TA98, na presença e na ausência de mistura S9. Os pesquisadores concluíram que o tratamento dos extratos com cobre reduzido era eficiente na remoção de compostos tóxicos que influenciavam a detecção da mutagenicidade. Também verificaram que diferentes concentrações de S9 modulavam esta resposta.

Três diferentes metodologias foram utilizadas para avaliar a genotoxicidade de sedimentos contaminados por uma mistura de HPAs provenientes de uma planta de gaseificação de carvão abandonada. Este estudo de Randerath *et al* (1999) tinha como objetivo principal determinar se e de que maneira as concentrações de HPAs carcinogênicos poderiam prever a mutagenicidade em bactérias ou a habilidade em formar adutos de DNA, seja *in vivo* ou *in vitro*. As análises químicas revelaram grande quantidade de HPAs. Tanto ensaios de mutagênese bacteriana, como ensaios para verificação de adutos de DNA foram capazes de detectar respostas positivas em todas as amostras analisadas. Não foi detectada atividade mutagênica na ausência de S9 nos testes com *Salmonella*. Nos ensaios de adutos induzidos *in vitro*, verificou-se a presença de compostos capazes de reagir diretamente com o material genético. Os pesquisadores sugerem que o dano causado ao DNA poderia ter sido resultante de reações de radicais livres e da ação de agentes eletrofílicos. Os pesquisadores sugerem também a presença de metabólitos resultantes da transformação dos contaminantes por microrganismos presentes nos sedimentos. Os autores concluem que, a despeito das diferenças, as amostras continham HPAs genotóxicos e induziram uma resposta positiva em cada um dos bioensaios e que uma ou algumas classes de compostos dentro da mistura pode ter dominado a expressão da resposta genotóxica dos extratos.

O perfil químico e biológico dos sedimentos foi utilizado como indicador da contaminação no Porto de Hamilton, por Marvin *et al* (1999 e Marvin *et al* (2000), utilizando o teste de Ames acoplado ao fracionamento químico dos extratos orgânicos destas amostras. Os sedimentos foram extraídos com diclorometano e posteriormente metanol. Os pesquisadores coletaram também material particulado da coluna d'água, chamado de sedimento suspenso, que foi extraído com os mesmos solventes. O material extraído foi adsorvido em alumina, aplicado sobre uma coluna de alumina e

diferentes solventes foram utilizados em eluição sequencial: hexano, benzeno, diclorometano/metanol, metanol, metanol/água. O teste de Ames foi realizado com as linhagens YG1024 e YG1025. A estratégia adotada pelos autores foi utilizar a linhagem YG1025 com S9, que detectaria HPAs derivados principalmente de contaminação com fuligem de carvão e a linhagem YG1024 sem S9, que detectaria produtos de emissão veicular e de combustão. Os autores determinaram que os HPAs responsáveis pela atividade da YG1025+S9 eram principalmente os de 5 a 7 anéis, incluindo mutágenos e carcinógenos conhecidos, como benzo(a)pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno e dibenzo[a,h]antraceno. Os compostos com atividade direta, detectados com a YG1024-S9 foram determinados como sendo compostos aromáticos policíclicos polares e estavam relacionados a HPAs.

O trabalho de Picer *et al* (2001) relata a comparação entre dois ensaios, o teste de Ames e o ensaio de indução de oxidases de função mista - mixed function oxidase (MFO) induction test -, usados em paralelo a análises químicas na avaliação da contaminação de sedimentos da bacia do Rio Krka, na Croácia. As amostras de sedimento foram extraídas com éter de petróleo e metanol. O teste de Ames foi realizado com a linhagem TA98 com S9 preparado de fígado de carpa induzido com 3-metilcolantreno. Para avaliação da indução de enzimas hepáticas *in vivo*, carpas foram tratadas por injeção intraperitoneal com diferentes doses equivalentes de sedimento, em óleo de milho. A atividade da enzima benzo(a)pireno-monoxidase foi medida na fração posmitocondrial do homogenado de fígado de animais sacrificados após 48h depois do tratamento. Os pesquisadores concluem que o ensaio de indução de oxidases de função mista, aliado ao padrão obtido no cromatógrafo a gás, sejam ferramentas melhores para a detecção da presença de xenobióticos em ambientes aquáticos comparada ao teste de Ames.

Os sedimentos ao longo do Rio Pó, na Itália, foram avaliados quanto à sua contaminação, utilizando-se ensaios químicos e biológicos (Viganó *et al*, 2002; 2003). A mutagenicidade dos sedimentos foi verificada com o emprego do teste de Ames e também foram analisados biomarcadores de genotoxicidade em peixes. As amostras foram coletadas em 10 locais diferentes ao longo do rio, e o local situado nas proximidades da sua nascente foi considerado como referência. O teste de

mutagenicidade foi realizado nos extratos de sedimento, e também em extratos de bile coletada dos animais capturados em duas regiões com diferentes níveis de contaminação. Foram também investigados adutos de DNA em fígado e indução de micronúcleos em eritrócitos de peixes. As amostras de sedimento foram positivas para a linhagem YG1024+S9, com potências maiores em coleta realizada no inverno, comparada à coleta realizada no verão. Estudos preliminares demonstraram que não havia atividade mutagênica detectável com as linhagens TA98, TA100 e TA102, independentemente da presença de ativação metabólica. Os extratos de bile obtidos de peixes capturados em região contaminada apresentaram resposta mutagênica, assim como foram detectados adutos de DNA em células de fígado, além de um aumento na frequência de micronúcleos em eritrócitos destes animais. O estudo demonstra que a presença de compostos genotóxicos em sedimentos de rio pode ser correlacionada com as alterações verificadas em organismos que vivem no local.

Outros ensaios de genotoxicidade têm sido utilizados para caracterização de atividade mutagênica em sedimentos. O ensaio SOS cromoteste fundamenta-se na avaliação quantitativa de uma das funções SOS: a filamentação bacteriana (Quillardet *et al*, 1982). A linhagem utilizada no ensaio é a *E. coli* PQ37 que tem uma fusão dos operons *sfiA* :: *lacZ*, de forma que a produção de β -galactosidase (expressão do gene *lac Z*) está na dependência da indução do operon *sfiA*, ou seja, será produzida quando o sistema de reparo SOS da bactéria for ativado.

Foi utilizado por Dutka *et al* (1995) em estudo que visava aprimorar o emprego deste ensaio para avaliação de sedimentos sem necessidade de extração química e os pesquisadores mostraram que esta metodologia era bastante sensível para detectar agentes mutagênicos de ação direta, sendo eficiente na discriminação entre contaminantes genotóxicos e citotóxicos.

Este ensaio microbiano foi utilizado para avaliação da atividade genotóxica de várias matrizes ambientais na bacia do rio St. Lawrence, no Canadá, região de grande influência industrial, incluindo efluentes industriais, material particulado suspenso na coluna d'água, sedimentos e tecidos da biota local (White & Côté, 1998; White *et al*, 1998a, 1998b). Nestes estudos, os autores obtiveram resultados positivos nas

amostras estudadas, com valores equivalentes a cerca de 700 revertentes de TA98 por g de sedimento em base seca.

Bombardier *et al* (2001) compararam o uso de SOS cromoteste e uma modificação do teste de Ames em que o ensaio é realizado em microplacas, em sedimentos marinhos da Baie des Anglais, no Canadá e concluíram que o cromoteste pode ser usado para avaliar a presença de compostos genotóxicos em extratos de sedimentos. Os resultados, porém, mostraram a necessidade de se usar testes mais sensíveis para confirmação, principalmente no que diz respeito a agentes de ação direta.

O bioensaio conhecido como Mutatox™ foi desenvolvido em 1992 pela Microbics Corp. da Califórnia, nos Estados Unidos, e detecta atividade genotóxica pela habilidade da amostra teste em restabelecer a luminescência de uma linhagem mutante da bactéria marinha *Vibrio fischeri* (USEPA, 1995). Foi avaliado como método eficiente por Ho & Quinn (1993) em ensaios acoplados a fracionamentos químicos de extratos de sedimentos coletados no porto de Black Rock, em Connecticut, nos Estados Unidos.

O potencial mutagênico de sedimentos contaminados dragados de diferentes regiões dos Estados Unidos foi avaliado com o objetivo de comparar o Mutatox™ com o teste de Ames (Jarvis *et al*, 1996). A comparação entre o Mutatox™ e a linhagem TA98+S9 indicou concordância em 80% das respostas dos extratos de sedimento avaliados, tanto negativas como positivas, mas apenas em 50% em relação à TA100, na mesma condição. Sem ativação metabólica, 50% dos extratos apresentaram resposta semelhante entre Mutatox™ e TA98 e 90% quando a comparação foi feita com a TA100. Em alguns casos, TA98 (50%) e TA100 (10%) indicaram a presença de compostos genotóxicos diretos nas amostras, enquanto que o Mutatox™ não detectou atividade mutagênica sem S9 em nenhum dos extratos testados. Os autores também concluem que, embora o Mutatox™ seja um ensaio mais rápido e que pode ser utilizado em estudos preliminares, não tem sensibilidade para detectar compostos genotóxicos de ação direta.

A genotoxicidade de extratos químicos de sedimentos estuarinos de 28 diferentes locais na Inglaterra foi avaliada com o uso do Mutatox™ na presença de S9 (Thomas *et al*, 2002). Os autores encontraram respostas positivas em 25% das amostras e esta atividade foi correlacionada com alguns contaminantes determinados quimicamente.

Ensaio *in vitro* com organismos eucariotos também foram realizados para verificação da genotoxicidade de sedimentos. Cultura primária de hepatócitos de truta arco-íris foram utilizados por Gagné *et al* (1995) para avaliação da atividade mutagênica de extratos de sedimentos localizados nas proximidades de cais que foram tratados com creosoto para conservação da madeira, material rico em HPAs. Foram avaliados "gaps" e quebras de fita de DNA. Os resultados indicaram eficiência dos ensaios na detecção de compostos genotóxicos persistentes nos extratos de sedimento avaliados, porém não há correlações entre os danos observados e a quantidade de HPAs determinadas nas amostras. As mesmas células foram utilizadas por Gagné *et al* (1999), em estudos de aprimoramento de metodologias, onde se investigou outros parâmetros além da genotoxicidade em amostras de sedimentos coletados no porto de Hamilton, na baía de Toronto e no lago St. Clair, no Canadá.

Sedimentos do Rio Tibre e alguns dos seus tributários, nas cercanias da região metropolitana de Roma, na Itália, foram estudados quanto a sua atividade genotóxica (Minissi *et al*, 1998). Esta avaliação se deu pela análise da formação de micronúcleos, ensaio que verifica a indução de quebras cromossômicas, em raízes de *Vicia faba* expostas diretamente a uma mistura de sedimento com argila sintética (1:1). Também foram feitas análises químicas para a determinação de contaminantes como metais pesados e HPAs. Os autores não conseguiram demonstrar correlação entre as concentrações de compostos genotóxicos presentes nas amostras com o aumento da frequência de micronúcleos.

No final da década de 80, um novo ensaio foi desenvolvido que contorna parte das dificuldades encontradas nos ensaios citogenéticos e tem sido considerado especialmente prático para estudos relacionados com a detecção de danos no material genético de organismos sentinela, o "Single Cell Gel Assay", ou teste do Cometa.

Neste ensaio, as células são aplicadas em um gel de agarose sobre uma lâmina de microscópio e a seguir lisadas e submetidas a um campo elétrico em tampão alcalino. A presença de quebras simples, sítios lábeis alcalinos e “crosslinks” resultantes da ação de compostos genotóxicos, altera a estrutura do DNA das células, que normalmente está superenrolado e fortemente compactado, causando relaxamento em partes da molécula que migram em direção ao anodo. Desta forma, após aplicação de corantes específicos, pode-se visualizar em microscópio de fluorescência a migração do DNA, que se assemelha a um cometa. Acredita-se que a capacidade que o DNA tem de migrar é função tanto do tamanho da molécula como da quantidade de extremidades livres (quebras, por exemplo). O tamanho da cauda aumenta proporcionalmente à quantidade de danos e a intensidade da fluorescência na cauda em relação àquela do corpo do cometa fornece informações sobre a quantidade de quebras no DNA. Assim, pode-se avaliar o dano genético tanto por meio da medida do comprimento da cauda do cometa, como pela quantidade de DNA presente, sendo ambos função das doses de exposição (Singh *et al.*, 1988; Fairbain *et al.*, 1995).

Este ensaio foi utilizado como indicador de atividade mutagênica em mexilhões expostos cronicamente a sedimentos contaminados em dois locais na costa da Irlanda e os autores demonstraram que as brânquias, tecidos das glândulas digestivas e em menor instância, a hemolinfa, possuíam um grau de dano no material genético maior que os indivíduos que habitavam o local de referência e que estas alterações poderiam estar relacionadas à contaminação por HPAs e metais pesados (Coughlan *et al.*, 2002).

Empregando o mesmo ensaio, Kammann *et al.* (2000) puderam verificar quebras de DNA induzidas *in vitro* em leucócitos isolados de carpas expostas a extratos químicos de sedimentos marinhos coletados no Mar do Norte. Este grupo de investigadores estabeleceu um protocolo de avaliação da genotoxicidade de sedimentos coletados no Mar do Norte, com o ensaio Cometa para verificação do dano induzido no DNA células em cultura de uma linhagem permanente de tumor de pele de carpa (Kammann *et al.*, 2001).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram analisadas 24 amostras de sedimento, coletadas na região de Pirapora do Bom Jesus e na Baixada Santista, ambas no estado de São Paulo. Os locais de amostragem foram cuidadosamente escolhidos em visitas prévias aos locais de estudo, levando-se em consideração a representatividade do ponto de coleta e outros fatores, como acesso, facilidade de amostragem, etc.

Para avaliar a genotoxicidade da matriz sedimento, normalmente é realizada uma extração orgânica para recuperação da maior quantidade possível de compostos com atividade mutagênica no extrato final e a menor quantidade de interferentes que possam dificultar a avaliação destes extratos frente aos testes de mutagenicidade.

O presente estudo foi realizado em duas etapas (Figura 1): Etapa I, onde diferentes metodologias foram comparadas e avaliadas e Etapa II, onde as técnicas que se mostraram mais adequadas na Etapa I foram utilizadas dentro do programa de caracterização da contaminação da Baixada Santista.

Na Etapa I, a avaliação da genotoxicidade do extrato bruto de sedimentos coletados na represa de Pirapora do Bom Jesus não revelou atividade mutagênica nas amostras avaliadas. Por se tratar de um local que recebe grande parte dos contaminantes vindos da região metropolitana de São Paulo através do Rio Tietê, suspeitou-se da presença de interferentes ou interações entre os compostos na mistura, que impedissem a detecção da atividade mutagênica. Esta hipótese foi testada através do fracionamento do extrato e posterior análise da mutagenicidade das diferentes frações. Não foi observada atividade mutagênica com as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, usualmente empregadas para avaliação da mutagenicidade de amostras ambientais. Em razão dos resultados obtidos, foram também testadas outras linhagens de *S.typhimurium*, com sensibilidades diferentes, objetivando garantir a detecção de outros compostos com atividade mutagênica que porventura não tivessem sido detectados nos ensaios anteriores. Ainda assim, os resultados negativos foram confirmados.

Já o extrato bruto de amostra de sedimento coletada em Cubatão apresentou atividade mutagênica; sendo este local e outros da região da Baixada Santista escolhidos para comparação de diferentes metodologias de preparo de amostras, através de diferentes métodos para separação da água presente na matriz e extração orgânica com diferentes combinações de solventes. Foram também comparados os métodos de pré-incubação do extrato com a cultura bacteriana por 30 minutos a 37°C antes de serem vertidos nas placas de ágar mínimo e o método de incorporação dos extratos diretamente às placas, acrescidos das culturas bacterianas.

A Etapa II consistiu na avaliação da genotoxicidade de sedimentos coletados em locais diferentes na Baixada Santista, dentro do projeto da CETESB de caracterização da contaminação desta região, verificando-se então a eficiência das metodologias escolhidas.

Serão apresentadas, inicialmente, as metodologias de análise que foram comuns a todas as fases do estudo e, a posteriori, as particularidades de cada método empregado, em cada etapa.

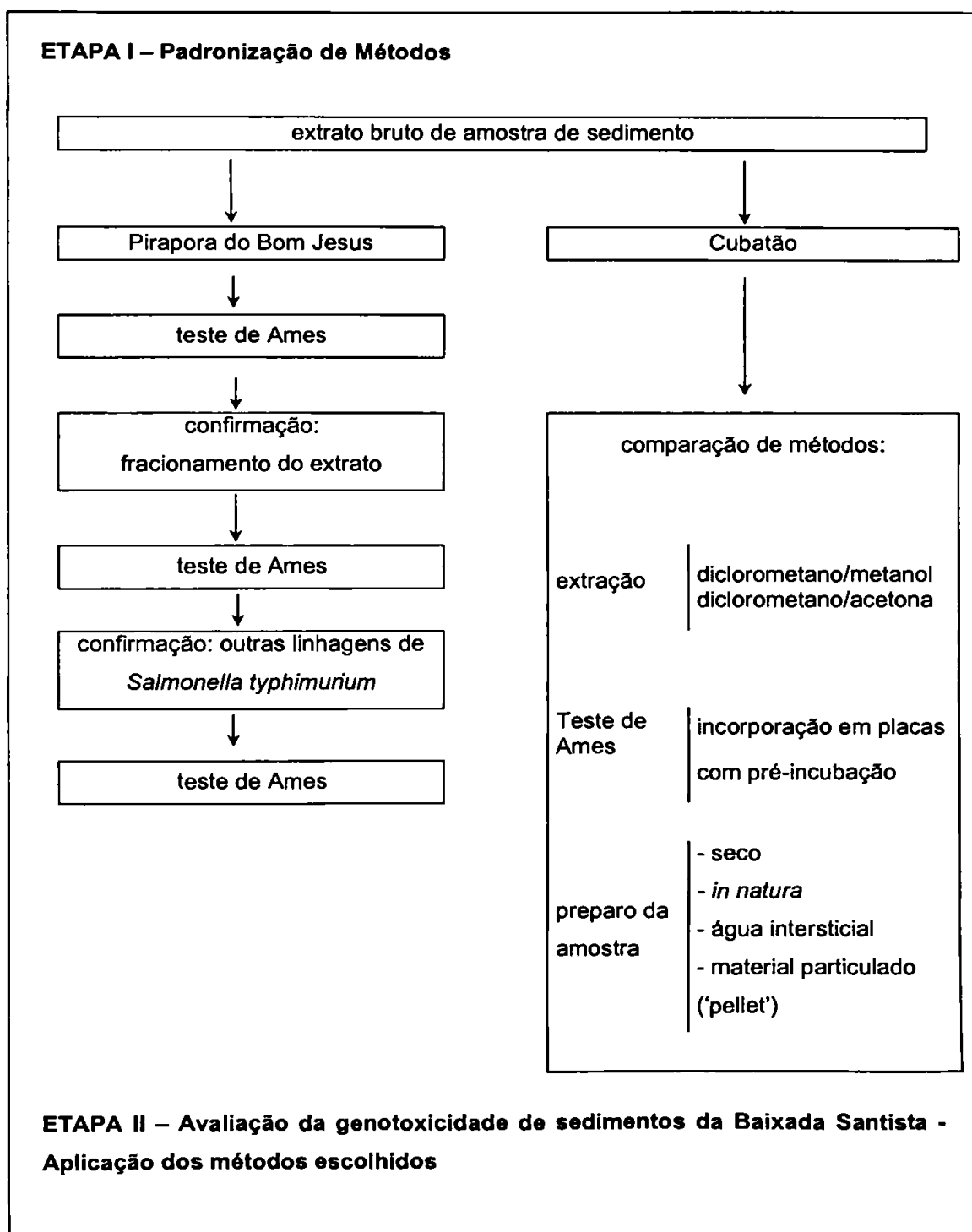


Figura 1 – Representação esquemática das etapas deste estudo

4.1 MÉTODOS COMUNS ÀS ETAPAS DO ESTUDO

4.1.1 COLETA DE SEDIMENTOS

As amostras de sedimento foram coletadas com draga de Van Veen (Figura 2), em quantidades aproximadas de 500g. Foram acondicionadas em recipientes plásticos atóxicos, preenchendo todo o frasco para minimizar processos de oxidação, e transportadas ao laboratório em caixas de isopor com gelo.



Figura 2 – Draga de Van Veen

4.1.2 TESTE DE GENOTOXICIDADE – TESTE DE AMES

Neste estudo, o teste de Ames foi realizado segundo Maron & Ames (1983) e CETESB (1993). As linhagens de *Salmonella typhimurium* empregadas foram periodicamente testadas para verificação de suas características genéticas e taxa de reversão espontânea. Os ensaios foram realizados na ausência e na presença de ativação metabólica. A mistura S9 foi preparada utilizando-se a fração S9 de rato, induzido com Aroclor, adquirida liofilizada (Moltox Inc, EUA), sempre fresca, a cada ensaio.

A cada ensaio foram incluídos: um controle negativo, dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma - 100µL) e controles positivos, 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO - 0,15 a 0,50µg/placa, dependendo da linhagem teste) para ensaios sem metabolização e 2-aminoantraceno (2AA - 2,5µg/placa) para aqueles com ativação metabólica.

Teste por Incorporação em placas

Diferentes concentrações do extrato, em volumes apropriados, foram colocados diretamente em tubo contendo ágar de superfície, juntamente com 100µL de cultura bacteriana crescida “overnight” contendo aproximadamente 10^9 células por mL e 500µL de mistura S9, quando a presença de ativação metabólica era requerida. Todos os testes foram realizados em triplicata. Uma vez homogeneizado, o conteúdo dos tubos foi vertido em placas de ágar mínimo. As placas foram incubadas a 37°C durante 66 horas e o número de colônias foi contado em contador automático tipo AccuCount (Biologics. Inc.). Um esquema deste procedimento encontra-se na Figura 3a.

Teste com pré-incubação

Diferentes concentrações de cada extrato e/ou frações por placa foram testados em triplicata, misturando-se a amostra com 100µL de cultura bacteriana crescida “overnight” (cerca de 10^9 células/mL) e 500µL de mistura S9, quando utilizado o sistema de ativação metabólica, mantendo-se os tubos a 37°C durante 30 minutos. Após o período de incubação, 3mL de ágar de superfície previamente fundido foram adicionados e o conteúdo dos tubos vertido em placas de ágar mínimo. As placas foram incubadas a 37°C durante 66 horas e o número de colônias foi contado em contador automático, conforme descrito anteriormente. Um esquema deste procedimento encontra-se na Figura 3b.

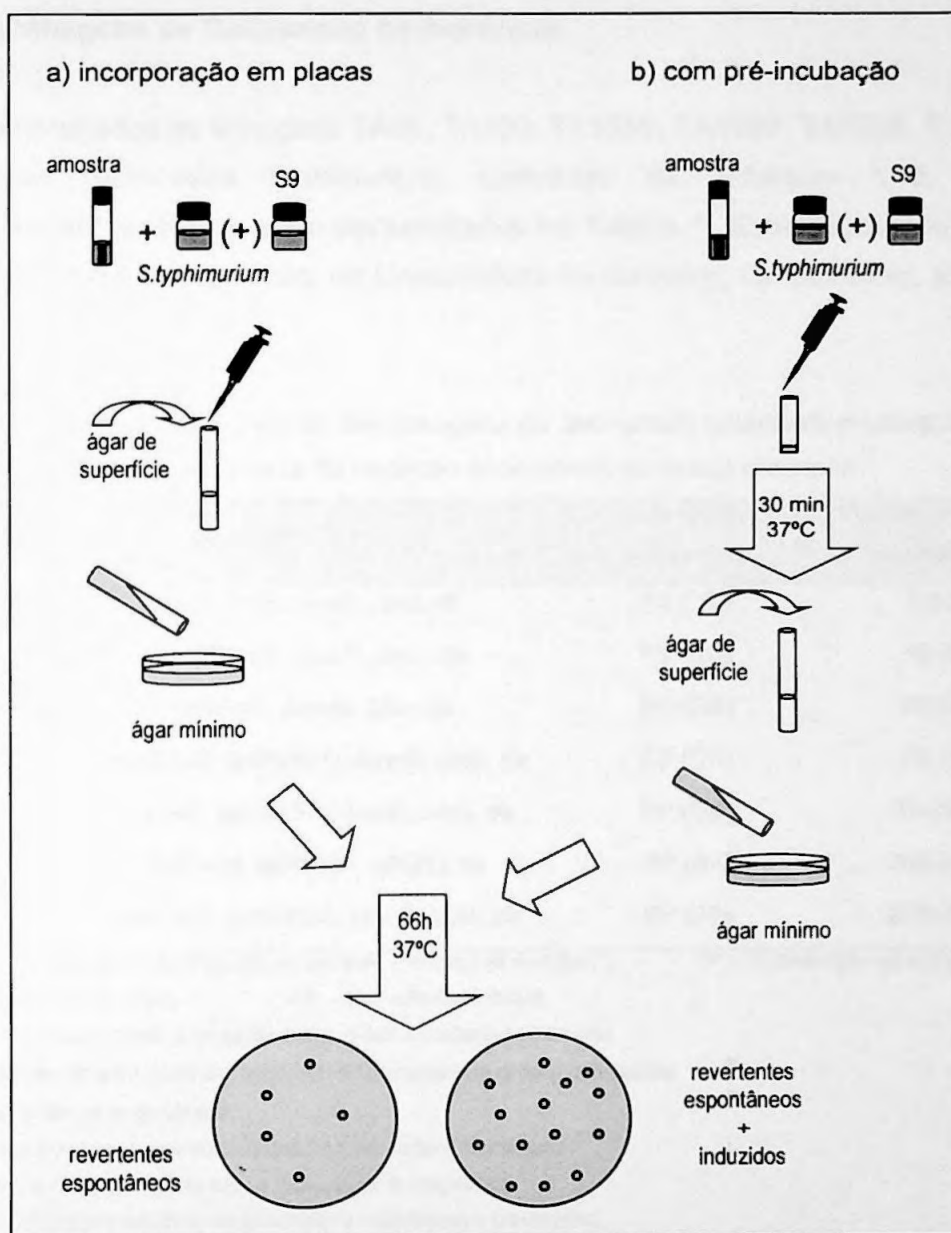


Figura 3 – Esquema da realização de teste de Ames, incorporação em placas (Maron & Ames, 1983 e CETESB, 1993) e com pré-incubação

4.1.2.1 Linhagens de *Salmonella typhimurium*

Foram empregadas as linhagens TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538, TA102 e TA104 de *Salmonella typhimurium*, derivadas da linhagem LT2, cujas características genéticas estão apresentadas na Tabela 1. Estas linhagens foram cedidas pelo prof. Bruce Ames, da Universidade de Berkeley, na Califórnia, Estados Unidos.

Tabela 1. Características genéticas das linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas nos ensaios de genotoxicidade e taxa de mutação espontânea esperada por placa

Linhagem <i>S.typhimurium</i>	genótipo	tipo de mutação detectada	taxa de reversão espontânea
TA1537	<i>hisC3076, ΔuvrB, Δbio, rfa</i>	FS (CG)	5-25
TA1538	<i>hisD3052, ΔuvrB, Δbio, rfa</i>	FS (CG)	15-35
TA1535	<i>hisG46, ΔuvrB, Δbio, rfa</i>	BP (CG)	20-35
TA98	<i>hisD3052 (pKM101), ΔuvrB, Δbio, rfa</i>	FS (CG)	25-75
TA100	<i>hisG46 (pKM101), ΔuvrB, Δbio, rfa</i>	BP (CG)	75-225
TA102	<i>hisG428 (pKM101, pAQ1), rfa</i>	BP (AT)	240-320
TA104	<i>hisG428 (pKM101), ΔuvrB, Δbio, rfa</i>	BP (AT)	275-475

FS – Deslocamento do quadro de leitura do DNA ("frameshift mutation")

BP – Substituição de par de base

CG – alvo citosina / guanina

AT – alvo adenina / timina

his – gene onde se localiza a mutação que impede a síntese de histidina

$\Delta uv r B$ – deleção do gene *uvrB* que participa do processo de reparo de excisão

Δbio – deleção do gene da biotina

rfa – mutação que altera a permeabilidade da membrana bacteriana

pKM101 – plasmídio com gene *muc* e resistência à ampicilina

pAQ1 – mutação para histidina no plasmídio e resistência a tetraciclina.

4.1.2.2 Verificação das características genéticas das linhagens – Placa Master

As linhagens de *Salmonella typhimurium* foram estocadas no laboratório congeladas em freezer -70°C , em ampolas apropriadas, utilizando-se 10% de dimetilsulfóxido (DMSO – grau espectrométrico, Merck) como agente crioprotetor. As culturas para uso em rotina (Placas Master) foram mantidas em geladeira, em placas de ágar mínimo suplementado com biotina, histidina. Para o caso de linhagens com plasmídio pKM101 também foi adicionada ampicilina e tetraciclina, no caso da linhagem TA102.

Para o preparo da Placa Master, uma ampola da linhagem desejada foi retirada do freezer, descongelada e seu conteúdo inoculado em 30mL de caldo nutriente. Após incubação "overnight", a 37°C, sob agitação de 150-170rpm, estriou-se a cultura em placa de ágar nutriente, que foi incubada "overnight", em estufa na mesma temperatura, para obtenção de colônias isoladas.

Cinco colônias isoladas foram escolhidas ao acaso e cada uma transferida para um tubo contendo 5mL de caldo nutriente. Após incubação a 37°C, sob agitação, "overnight", cada tubo contendo uma cultura derivada de uma colônia foi utilizado para o preparo de uma Placa Master da linhagem de interesse.

Para o preparo da Placa Master propriamente dita, ou seja, a placa para uso em rotina, cada cultura foi inoculada na forma de estrias grossas, em placas de ágar mínimo, suplementadas com histidina e biotina. Para linhagem contendo plasmídeo pkM101 também era adicionada ampicilina (e tetraciclina, para a TA102). Após incubação a 37°C "overnight", as placas foram seladas com parafilme e acondicionadas em geladeira para uso durante os dois meses subseqüentes.

Para verificação da auxotrofia para histidina, a mesma cultura era inoculada em placas de ágar mínimo com e sem o aminoácido. Após incubação a 37°C "overnight", deveria haver crescimento na placa com histidina e não haver crescimento na placa sem histidina.

Para verificação da mutação *rfa*, foram utilizados discos de papel de filtro embebidos com solução de cristal violeta 1%, colocados no centro de uma placa de ágar nutriente, previamente inoculada com a cultura bacteriana. Após incubação "overnight", a 37°C, um halo mínimo de 14mm deveria ser verificado ao redor do disco.

Para verificação da deleção do gene *uvrB*, metade de uma placa, previamente inoculada com a cultura de interesse, foi coberta e a placa toda irradiada com luz ultravioleta germicida (245nm), de 15W, a uma distância de 60cm, por 15 segundos. Após incubação "overnight" a 37°C, o crescimento bacteriano era observado. Na parte não irradiada (coberta) o crescimento deveria ser normal

enquanto que na parte descoberta da placa nenhum crescimento bacteriano deveria ser verificado.

A presença do plasmídeo pKM101 era verificada aplicando-se (em forma de X) com auxílio de uma alça de inoculação uma solução de ampicilina (8mg/mL) em uma placa de ágar nutriente. Após a secagem a linhagem bacteriana de interesse era inoculada sobre o antibiótico. As linhagens com plasmídeo pKM101 deveriam crescer normalmente. Para as linhagens sem plasmídeo não se esperaria crescimento ao redor do local onde foi aplicada a ampicilina.

A taxa de reversão espontânea foi avaliada, em triplicata, através da inoculação de 100µL da cultura bacteriana em um tubo contendo 2,5mL de ágar de superfície, previamente fundido e estabilizado a 45°C. O conteúdo do tubo foi homogeneizado e vertido em placa de ágar mínimo, e esta incubada após a solidificação do ágar em estufa a 37°C, por 48h. O número de colônias observado após este período deveria se encontrar dentro da faixa esperada (Tabela 1).

Para uso na rotina, uma alíquota da estria da Placa Master era retirada com alça de platina e inoculada em 30mL de caldo nutriente, no final da tarde do dia anterior ao teste. Este caldo ficava sob agitação (150-170 rpm) durante 18-20h, a 37°C, de forma a se obter uma densidade de cerca de 2×10^9 bactérias/mL .

Congelamento de Linhagens

Para o congelamento, utilizou-se sempre a linhagem aprovada nos testes descritos acima. A um inóculo de 900µL de cultura bacteriana adiciona-se 100µL de DMSO, em ampola apropriada. As culturas foram congeladas em freezer a -70°C.

4.1.2.3 Expressão e interpretação de resultados de teste de Ames

Foram calculadas as médias do número de revertentes por placa e a razão de mutagenicidade (RM), para cada uma das concentrações testadas. O valor de RM é a razão entre o número de revertentes na placa teste (revertentes espontâneos e revertentes induzidos) e o número de revertentes na placa controle (revertentes espontâneos).

Os dados foram submetidos a uma análise estatística que consistiu de uma análise de variância (ANOVA), seguida de regressão linear, utilizando-se o programa de computador "Salanal", especialmente desenvolvido para este fim e cedido gentilmente pelo Integrated Laboratory Systems, Research Triangle Park, Carolina do Norte, EUA.

As amostras foram consideradas positivas quando a média de revertentes por placa em pelo menos uma das concentrações testadas diferia significativamente ($p \leq 0,05$) da média de revertentes por placa do controle negativo, e se observava relação dose-resposta significativa entre as concentrações testadas. Adicionalmente, para as linhagens TA98, TA100, TA102 e TA104, o valor de RM deveria ser maior ou igual que dois e maior ou igual a três para as linhagens TA1535, TA1537 e TA1538, devido à baixa taxa de reversão espontânea destas linhagens. O potencial mutagênico foi expresso em revertentes/g equivalentes de sedimento.

4.1.2.4 Meios de Cultura e Soluções

a. Meio de Vogel Bonner E (50x)

componente do ágar mínimo

Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	10g
Ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	100g
Fosfato de sódio e amônio ($NaH_2PO_4 \cdot 4H_2O$)	175g
Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4)	500g
Água destilada morna	1L

Após esterilização por 30 minutos a $121^\circ C$, o meio deve ser estabilizado a $55^\circ C$ em banho-maria.

b. Solução de glicose 10%

componente do ágar mínimo

Glicose (Merck)	20g
Água destilada	200mL

Após esterilização por 20 minutos a $121^\circ C$, o meio deve ser estabilizado a $5^\circ C$ em banho-maria.

c. Solução de ágar

componente do ágar mínimo

Bacto ágar (Difco)	15g
Água destilada	180mL

Após esterilização por 30 minutos a 121°C, o meio deve ser estabilizado a 55°C em banho-maria.

d. Solução de biotina e histidina 0,5mM

componente do ágar mínimo

D-biotina (Sigma)	0,012g
L-histidina (Sigma)	0,011g
Água destilada quente	100mL

Após autoclavação a 121°C por 20 minutos, a solução pode ser estocada em refrigerador.

e. Ágar mínimo

utilizado no ensaio de mutagenicidade

Solução de glicose 10%	200mL
Solução de ágar	780mL
Meio Vogel Bonner (50x)	50mL
Solução de biotina e histidina 0,5mM	12mL

Os compostos são misturados assepticamente e volumes de 20mL são distribuídos em placas de Petri descartáveis estéreis. Placas esterilizadas com óxido de etileno, ou qualquer outro método químico, não devem ser utilizadas.

f. Caldo nutriente

utilizado para o crescimento das linhagens

Caldo nutriente (Oxoid nº 2)	25g
Água destilada	1L

Esterilizados por 20 minutos a 121°C em frascos com tampa de rosca contendo volumes de 30mL.

g. Ágar de superfície

utilizado fundido durante o ensaio como veículo para linhagens, amostra e mistura S9.

Bacto agar (Difco)	6g
Cloreto de sódio (NaCl)	5g
Água destilada	1L

Volumes de 150mL são distribuídos em frascos com tampa de rosca e submetidos à esterilização em autoclave por 20 minutos a 121°C.

h. Ágar Nutriente

utilizado nos testes para avaliação das características genéticas.

Caldo nutriente (Oxoid nº2)	25g
Bacto agar (Difco)	15g
Água destilada quente	1L

Após autoclavação por 20 minutos a 121°C volumes de 25mL são distribuídos em placas de Petri estéreis e descartáveis.

i. Solução de biotina 0,5mM

utilizado nos testes para avaliação das características genéticas e no preparo de placas Master.

D-biotina	0,012g
Água destilada quente	100mL

A solução deve ser estocada em refrigerador após esterilização por 20 minutos a 121°C.

j. Solução de histidina 0,5%

utilizado nos testes para avaliação das características genéticas e no preparo de placas Master.

L-histidina	0,5g
Água destilada quente	100mL

A solução deve ser estocada em refrigerador após esterilização por 20 minutos a 121°C.

k. Solução de ampicilina 8mg/L

utilizado nos testes para avaliação das características genéticas e no preparo de placas Master.

Ampicilina (Sigma)	0,08g
Hidróxido de sódio (NaOH) 0,02N	10mL

Esterilização em membrana filtrante de 0,22µm (MILLIPORE) e armazenamento em frasco escuro no refrigerador.

l. Solução de cristal violeta 1%

utilizado nos testes para avaliação das características genéticas.

Cristal violeta (Merck)	0,01g
Água destilada	10mL

A solução deve ser estocada à temperatura ambiente em frasco escuro. Não requer esterilização.

m. Ágar mínimo para preparo de Placas Master

utilizado no preparo das placas Master

Preparar ágar mínimo como descrito no item e., substituindo a solução de biotina e histidina 0,5mM pelos compostos:

D-biotina	0,66mg/L
L-histidina	50mg/L
ampicilina	25,2mg/L

n. Tampão Fosfato 0,2M

utilizado na composição da mistura S9

Solução A:

Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	2,84g
Água destilada	100mL

Solução B:

Fosfato de sódio monobásico (NaH ₂ PO ₄)	2,76g
Água destilada	100mL

Solução A	81mL
Solução B	19mL

pH ajustado para 7,4 com uma das soluções

Esterilização por autoclave por 20 minutos a 121°C e armazenamento em geladeira.

o. Solução de Glicose-6-Fosfato 1M

utilizado na composição da mistura S9

Glicose-6-fosfato (Sigma)	2,821g
Água destilada	10mL
Esterilização em membrana filtrante de porosidade 0,22µm (MILLIPORE).	
Armazenar em freezer a -20°C.	

p. Solução de NADP 0,1M

utilizado na composição da mistura S9

β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (Sigma)	0,7654g
Água destilada	10mL
Esterilização em membrana filtrante de porosidade 0,22µm (MILLIPORE).	
Armazenar em freezer a -20°C.	

q. Solução de Sais (KCl 1,65M/MgCl₂ 0,4M)

utilizado na composição da mistura S9

Cloreto de magnésio (MgCl ₂ · 6H ₂ O)	8,13g
Cloreto de potássio (KCl)	12,3g
Água destilada	100mL
Após autoclavação, por 20 minutos a 121°C, armazenamento em geladeira.	

r. Fração S9

utilizado na composição da mistura S9

Reconstituir assepticamente a Fração S9, adquirida liofilizada e armazenada em freezer a -20°C, com 2,1mL de água destilada estéril, conforme instruções do fabricante (Moltox Inc.).

s. Mistura S9

utilizado nos testes de mutagenicidade para ativação metabólica in vitro

Água destilada estéril	39,5mL
Tampão fosfato 0,2M	50mL
Solução de NADP 0,1M	4mL
Glicose-6-fosfato 1M	0,5mL
Solução de sais (KCl/MgCl ₂)	2mL
Fração S9	4mL

Preparada assepticamente e mantida sob refrigeração durante seu uso. Ao final do ensaio deve ser descartada.

t. Solução de 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO)

utilizado nos testes de mutagenicidade para ativação metabólica in vitro

4-nitroquinolina-1-óxido (Sigma)	1µg
DMSO	20mL

Alíquotas em tubo tipo eppendorf para uso na rotina. Armazenamento em freezer a -20°C.

u. Solução de 2-aminoantraceno (2AA)

utilizado nos testes de mutagenicidade como controle positivo

2-aminoantraceno (Sigma)	5µg
DMSO	20mL

Alíquotas em tubo tipo eppendorf para uso na rotina. Armazenamento em freezer a -20°C.

4.2 ETAPA I – PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS

Iniciamos nosso projeto como parte de um estudo da CETESB na região da represa de Pirapora de Bom Jesus, que à época apresentava a formação de espuma na sua superfície, em camadas que variavam de 0,3 a 1,5m de altura (Figura 4). Este corpo d'água recebe as águas do Rio Tietê da região da Grande São Paulo e grande concentração de poluentes deposita-se no sedimento da represa (CETESB, 1995).

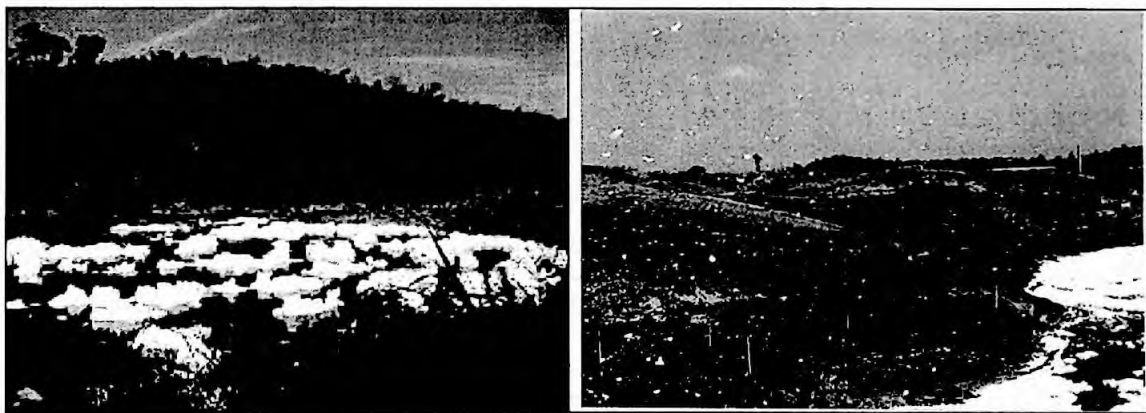


Figura 4 – Fotografias do reservatório de Pirapora do Bom Jesus, onde se verifica a formação de espuma superficial

Como a análise da mutagenicidade do extrato orgânico total dessas amostras de sedimento apresentou resultados negativos, esta etapa do nosso estudo teve por objetivo verificar se o fracionamento e posterior análise da mutagenicidade das frações poderia revelar uma atividade mutagênica que não estava sendo detectada. O fracionamento poderia separar os possíveis compostos tóxicos para as linhagens teste, causadores de mortalidade, dos compostos genotóxicos. A solubilidade e a toxicidade de um composto são fatores limitantes na avaliação da genotoxicidade de uma substância ou mistura. Muitas vezes, a toxicidade de uma amostra para as linhagens do teste de Ames faz com que seja necessário testar concentrações mais baixas, dificultando a detecção de compostos mutagênicos que podem estar presentes (Fabacher *et al*, 1988).

4.2.1 SEDIMENTOS DE PIRAPORA DO BOM JESUS

Foram coletadas duas amostras de sedimento de 500g, de acordo com o item 4.1.1.

A amostra BJ1 foi retirada de um banco de areia situado na proximidade da divisa dos municípios de Pirapora do Bom Jesus e Santana do Parnaíba, próximo ao canal principal, em área de remanso. O outro ponto de amostragem, amostra BJ2, estava situado no último braço da barragem, em frente e à esquerda do Reservatório de Pirapora, próximo à barragem.

4.2.1.1 Extração orgânica das amostras de Pirapora do Bom Jesus – Extratos Brutos

As amostras de sedimento foram deixadas à temperatura ambiente, em capela, até secagem completa. Do sedimento seco foram retirados 15g que foram macerados e ultrassonicados (900W, 25Hz, 10 minutos) em 50mL de uma mistura de diclorometano (DCM):metanol (2:1). O processo foi realizado três vezes. Os extratos foram filtrados em sulfato de sódio anidro, membrana AP20 (Millipore) e membrana de Teflon (Fluoropore – Millipore) e posteriormente concentrados em rotavapor à temperatura de 35°C. No momento do ensaio de genotoxicidade, volumes apropriados foram evaporados completamente em atmosfera de nitrogênio gasoso e ressuspensos em DMSO.

4.2.1.2 Extração orgânica das amostras de Pirapora do Bom Jesus – Fracionamentos

Alíquotas de 100g de amostras de sedimento foram extraídas conforme procedimento acima e após a secagem do extrato em rotavapor, 7g de alumina (Al_2O_3) previamente ativada a 450°C foram adicionadas ao extrato seco.

Alíquotas de 4g desta mistura foram acondicionados em coluna de vidro contendo alumina (7g) e sílica (8g), previamente ativadas a 450°C e 130°C, respectivamente

e pré-lavadas com 20mL de cada um dos solventes que seriam utilizados na eluição seriada. Um total de seis frações foi obtido com os seguintes solventes:

1ª Fração: 20mL Hexano

2ª Fração: 20mL 90% Hexano / 10% Diclorometano

3ª Fração: 40mL 80% Hexano / 20% Diclorometano

4ª Fração: 20mL 25% Hexano / 75% Diclorometano

5ª Fração: 20mL 95% Diclorometano / 5% Metanol

6ª Fração: 40mL Éter etílico

As frações foram secas em rotavapor e ressuspendidas em isoctano ou acetato de etila em volumes de 5mL. De cada fração, 1mL foi seco completamente em atmosfera de nitrogênio gasoso e ressuspendido em DMSO para análise de mutagenicidade.

Em paralelo, foram realizados brancos do extrato total e das frações, como controle negativo. Para tanto, as mesmas metodologias foram empregadas, sem amostra, utilizando-se os mesmos solventes e procedimentos que seriam usados na extração das amostras. A linhagem TA102 de *S.typhimurium* que foi empregada na avaliação da mutagenicidade dos brancos foi posteriormente substituída pela linhagem TA104, pois as múltiplas cópias do plasmídio a tornam muito instável em termos de taxa de reversão espontânea (Albertini & Gocke, 1988), dificultando seu uso rotineiro.

4.2.1.3 Análise de genotoxicidade das amostras de Pirapora do Bom Jesus

O teste de Ames foi realizado segundo Maron & Ames (1983) e CETESB (1993), usando o método de pré-incubação por 30 minutos a 37°C. Foram empregadas as linhagens TA1537, TA1538, TA98, TA1535, TA100 e TA104 de *Salmonella typhimurium* (Tabela 1). Diferentes concentrações de cada extrato e/ou frações foram testados em triplicata para as duas amostras. Os brancos também foram analisados, em quantidade correspondente à concentração máxima utilizada de amostra equivalente por placa.

4.2.2 SEDIMENTO DE CUBATÃO

Uma amostra de sedimento foi coletada em local altamente poluído, diretamente influenciado pela descarga de efluentes da COSIPA (Cia. Siderúrgica Paulista), conhecido como Ponto C, no município de Cubatão, na Baixada Santista. As águas deste local mostraram atividade mutagênica detectada pelo teste de Ames e a mutagenicidade estava associada ao material suspenso, indicando que o provável destino destes contaminantes seria o sedimento (Barreto, 1995). Esperava-se a presença, entre outros poluentes, de HPAs gerados durante a queima incompleta de carvão mineral, na coqueria.

4.2.2.1. Extração Orgânica - amostra do Ponto C de Cubatão

O extrato orgânico bruto do sedimento coletado em Cubatão foi preparado conforme o item 4.2.1.1.

4.2.2.2 Análise de genotoxicidade da amostra do Ponto C de Cubatão

O teste de Ames foi realizado segundo Maron & Ames (1983), usando o método de pré-incubação por 30 minutos a 37°C. Foram empregadas as linhagens TA1538, TA98, TA1535 e TA100 de *Salmonella typhimurium*. Foram testadas doses de 1, 10 e 100 mg de sedimento equivalentes por placa, em triplicata.

Como este sedimento apresentou atividade mutagênica, amostras deste local e de outros na Baixada Santista foram utilizadas na seqüência deste estudo.

4.2.3 COMPARAÇÃO DE MÉTODOS

Para comparar métodos de extração, teste de Ames e preparo de amostras, foram realizadas quatro campanhas de coleta na região do estuário de Santos, em três locais com diferentes graus de contaminação.

4.2.3.1 Locais de Coleta

A localização dos pontos de coleta pode ser observada na Figura 5. O ponto 1 corresponde ao Ponto C, local de descarga de efluentes da COSIPA, sofre

influência da cunha salina (Figura 6). O Ponto 2 situa-se no Rio Piaçaguera, a jusante do Rio Mogi, localizado atrás das instalações da siderúrgica, recebendo vários efluentes de diferente indústrias, porém não tem influência direta dos efluentes da coqueria (Figura 7). O ponto 3 está localizado no Rio Queiroz, com pouca influência de esgotos domésticos ou industriais e foi considerado neste estudo como ponto referência.

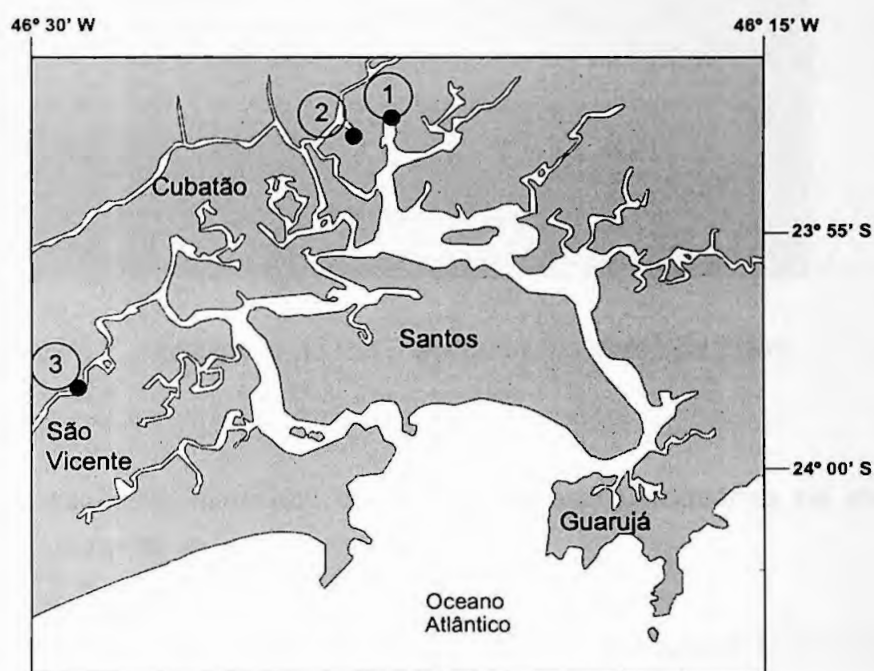


Figura 5 – Localização dos pontos de coleta: Ponto 1: Ponto C, Ponto 2: Rio Piaçaguera, Ponto 3: Rio Queiroz



Figura 6 – Fotografia da coleta no Ponto C

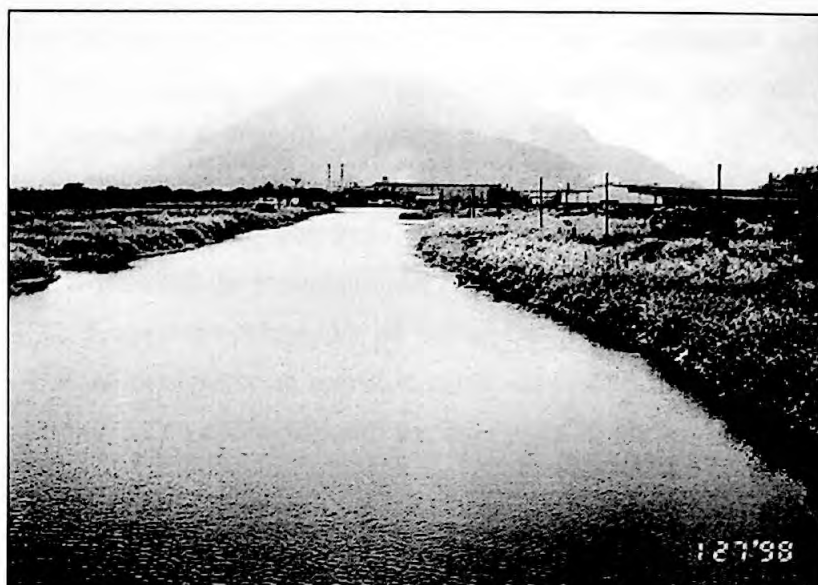


Figura 7 – Fotografia do Rio Piaçaguera no ponto de coleta

4.2.3.2 Comparação de Métodos: diferentes solventes utilizados na extração orgânica das amostras de sedimento

As amostras de sedimento dos pontos 1 e 2 da primeira campanha foram utilizadas para esta avaliação. O sedimento *in natura* foi homogeneizado e alíquotas de 30g foram extraídas através de ultrassonicação, tal qual em 4.2.1.1.

Duas combinações de solventes foram utilizadas: diclorometano/metanol (2:1) e diclorometano/acetona (1:1), segundo proposto por Grifoll *et al.* (1990) e USEPA (1985), respectivamente.

A comparação estatística entre os resultados obtidos foi realizada através de análise de regressão entre os resultados de mutagenicidade obtidos com os extratos resultantes das duas combinações de solventes.

4.2.3.3 Comparação de Métodos: Teste de Ames com e sem pré-incubação

Alguns compostos parecem ser mais eficientemente detectados utilizando-se o método com pré-incubação, como nitrosaminas, corantes tipo azo, compostos alílicos, nitrocompostos e outros (Gatehouse *et al* 1994).

O teste de Ames foi realizado segundo Maron & Ames (1983) e CETESB (1993), empregando-se o método de incorporação em placas e com pré-incubação por 30 minutos a 37°C. Foram empregadas as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*. Foram avaliados os extratos orgânicos obtidos com a combinação de solventes determinada no procedimento experimental descrito acima.

A comparação estatística entre os métodos foi realizada através de análise de regressão entre os resultados de mutagenicidade obtidos com os ensaios com pré-incubação e incorporação em placas.

4.2.3.4 Comparação de Métodos: Preparo de amostra de sedimento

O sedimento é composto basicamente de material particulado orgânico, inorgânico e água. A água intersticial, que é formada pela água que permeia as partículas durante o processo de sedimentação e fica isolada da coluna d'água, tem papel fundamental na adsorção/desorção de compostos orgânicos. A sua quantidade depende da porosidade do sedimento, determinada pela distribuição das partículas de diferentes tamanhos e seu grau de compactação (Kzenovich *et al.*, 1987). Os sedimentos, portanto, podem ser muito diferentes uns dos outros e as características físico-químicas e geológicas afetam diretamente a disponibilidade e degradabilidade de contaminantes presentes nestas matrizes. De maneira geral, espera-se que os compostos orgânicos mutagênicos, se presentes nos sedimentos, encontrem-se associados ao material particulado. Estas considerações serviram de base para as comparações metodológicas descritas a seguir.

Uma vez estabelecida a combinação de solventes a serem utilizados e o protocolo experimental para avaliação da genotoxicidade, outras três campanhas de coleta foram realizadas nos mesmos pontos e foi incluído o Ponto 3.

Foram utilizados três diferentes procedimentos de preparo da amostra: utilizando-se a amostra total *in natura*, amostra total seca ou a água intersticial separada do material particulado do sedimento:

amostra total *in natura* procedimento idêntico ao da 1a. campanha com a utilização de diclorometano/metanol.

amostra total seca as amostras foram deixadas em estufa a 45°C para secagem. Do sedimento seco, alíquotas de 30g foram maceradas e extraídas através de ultrassonicação, como descrito anteriormente.

amostra subdividida:

água intersticial um volume de 200g de sedimento foi centrifugado a 38 x g, durante 20 minutos. A água intersticial (sobrenadante) foi coletada e submetida a extração líquido-líquido. A água foi transferida para um funil de separação junto a 100mL de solvente (DCM/metanol 2:1) e este foi agitado vigorosamente por cerca de dois minutos, deixado em repouso por 3 a 5 minutos e a fase inferior coletada. O procedimento foi repetido por duas vezes, utilizando-se 50mL de solvente. O extrato foi concentrado em rotavapor e deixado em dessecador por 24 horas.

material particulado

O material particulado, obtido após a centrifugação (“pellet”) foi extraído por ultrassonicação tal como descrito em 4.2.1.1.

Os extratos foram armazenados em freezer a -20°C e, no momento do ensaio, volumes apropriados foram evaporados completamente em atmosfera de nitrogênio gasoso e ressuspensos em DMSO, de forma a obter as doses desejadas para teste. O teste de Ames foi realizado segundo Maron & Ames (1983) e CETESB (1993), empregando-se o método de incorporação em placas, conforme a padronização anterior. Foram empregadas as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*. A mutagenicidade foi expressa em revertentes/g equivalentes de sedimento.

4.3 ETAPA II – AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE SEDIMENTOS DA BAIXADA SANTISTA – APLICAÇÃO DOS MÉTODOS ESCOLHIDOS

Esta etapa do trabalho objetivou a utilização dos conhecimentos adquiridos até então na caracterização da genotoxicidade de sedimentos da Baixada Santista dentro de um programa da CETESB de levantamento da contaminação ambiental do sistema estuarino de Santos e São Vicente. O projeto abrangeu 26 pontos de amostragem, incluindo rios, estuários e o mar em toda a região de influência da contaminação hídrica e a determinação de cerca de 120 parâmetros diferentes (CETESB, 2001). Foi realizada uma série de análises ecotoxicológicas, envolvendo os diversos compartimentos ambientais (dados não publicados), onde se enquadra esta etapa do nosso estudo.

4.3.1. Locais de coleta

Nove dos 26 pontos de amostragem do projeto global foram analisados quanto à genotoxicidade de sedimentos. Os locais estão descritos em CETESB, 2001 e apresentados na Figura 8. O ponto 5 foi coletado e analisado em triplicada e se localiza próximo ao ponto C da etapa I deste estudo.

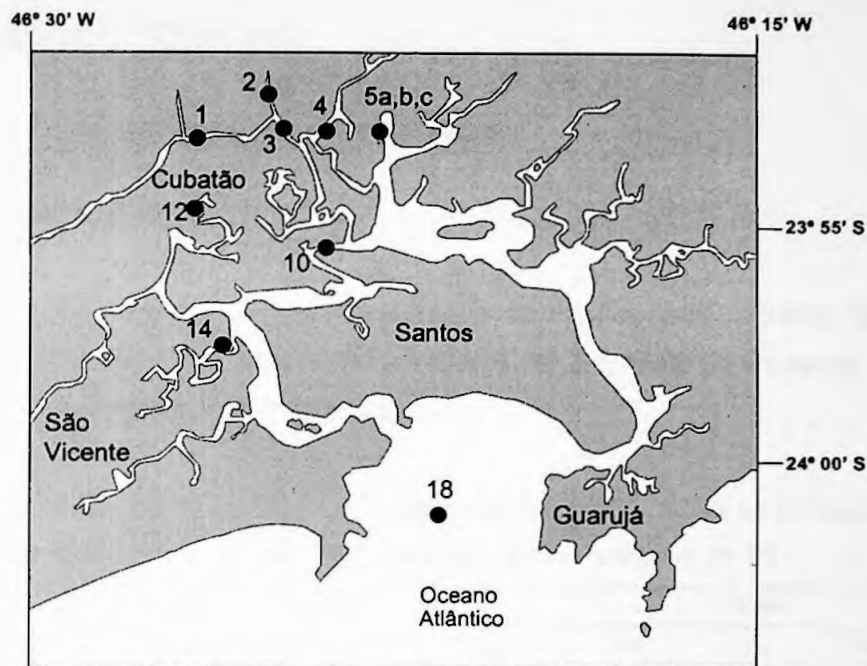


Figura 8 – Locais de amostragem do monitoramento da Baixada Santista (Pto 1 - R. Cubatão – barragem, Pto 2 - R. Perequê, Pto 3 - R. Cubatão - Pte Ferro, Pto 4 - R. Piaçaguera, Pto 5a, 5b, 5c – Bacia de Evolução COSIPA, Pto 10 - R. Casqueiro, Pto 12 - R. Santana, Pto 14 - R. Mariana, Pto 18 - Baía de Santos)

4.3.2. Avaliação da Genotoxicidade dos Sedimentos da Baixada Santista

Extração orgânica:

As amostras de sedimento foram extraídas quimicamente seguindo-se o procedimento estabelecido anteriormente, descrito no item 4.2.3.4, extração de amostra total seca. Para a realização dos ensaios de mutagenicidade, o solvente utilizado foi evaporado em atmosfera de nitrogênio gasoso e o extrato ressuspendido em DMSO.

Teste de Ames:

O teste de Ames foi realizado usando o método padrão de incorporação em placas, empregando-se as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*. Diferentes concentrações de cada extrato foram testadas em triplicata, sendo a concentração máxima de 500mg equivalentes de sedimento por placa. A mutagenicidade foi expressa em revertentes/g equivalentes de sedimento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ETAPA I – PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS

5.1.1 PIRAPORA DO BOM JESUS

Os resultados das análises de genotoxicidade realizadas nos extratos orgânicos brutos dos sedimentos dos dois locais coletados na Represa de Pirapora do Bom Jesus estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento BJ1, frente às linhagens TA98, TA100, TA104 e TA1537 de *S.typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Doses (mg sed. eq.)	TA98						TA100					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	22,00	3,39	-	33,80	11,82	-	198,00	17,93	-	229,75	13,15	-
10	29,00	0,00	1,3	43,00	5,20	1,3	145,33	14,50	0,7	309,00	39,60	1,3
25	36,67	8,08	1,7	57,00	12,00	1,7	TOX			289,67	4,73	1,3
50	29,33	4,51	1,3	44,50	2,12	1,3	TOX			275,00	22,87	1,2
75	26,00	2,83	1,2	36,67	3,51	1,1	TOX			TOX		
100	20,00	4,24	0,9	39,50	0,71	1,2	TOX			TOX		
Contr. Posit.	515,00	45,25	23,4	353,00	9,90	10,4	1311,50	20,51	6,6	1682,00	872,57	7,3
Resultado	ND						ND					
Doses (mg sed. eq.)	TA104						TA1537					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	356,60	10,57	-	454,25	10,08	-	10,40	4,83	-	17,75	6,40	-
10	429,33	31,21	1,2	448,00	36,77	1,0	14,00	4,36	1,4	11,50	0,71	0,7
25	311,33	32,35	0,9	473,00	36,77	1,0	12,50	0,71	1,2	14,33	4,04	0,8
50	TOX			585,33	63,76	1,3	9,00	3,00	0,9	22,00	1,73	1,2
75	TOX			540,00	28,62	1,2	TOX			23,67	3,79	1,3
100	TOX			TOX			TOX			22,67	1,53	1,3
Contr. Posit.	1094,00	22,63	3,1	1330,50	54,45	2,9	57,00	0	5,5	62,50	0,71	3,5
Resultado	ND						ND					

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, TOX – toxicidade para a linhagem teste

Tabela 3 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento BJ2, frente às linhagens TA98, TA100, TA104 e TA1537 de *S.typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Doses (mg sed. eq.)	TA98						TA100					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	22,00	3,39	-	33,80	11,82	-	198,00	17,93	-	229,75	13,15	-
1	27,50	4,95	1,3	31,67	4,51	0,9	173,00	18,38	0,9	333,33	17,62	1,5
5	30,67	1,53	1,4	44,00	7,00	1,3	TOX			331,00	7,55	1,4
10	41,00	9,00	1,9	61,00	14,73	1,8	TOX			345,00	7,94	1,5
25	41,00	3,00	1,9	54,67	10,69	1,6	TOX			TOX		
50	37,33	3,79	1,7	49,00	11,27	1,5	TOX			TOX		
100	TOX			54,67	10,12	1,6	TOX			TOX		
Contr. Posit.	515,00	45,25	23,4	353,00	9,90	10,4	1311,50	20,51	6,6	1682,00	872,57	7,3
Resultado	ND						ND					
Doses (mg sed. eq.)	TA104						TA1537					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	356,60	10,57	-	454,25	10,08	-	10,40	4,83	-	17,75	6,40	-
1	314,33	28,94	0,9	421,00	53,81	0,9	8,00	3,00	0,8	14,33	2,89	0,8
5	TOX			437,33	2,52	1,0	11,00	1,73	1,1	12,00	5,20	0,7
10	TOX			529,33	30,89	1,2	16,33	1,53	1,6	11,33	1,15	0,6
25	TOX			592,00	23,26	1,3	14,67	4,04	1,4	12,67	6,43	0,7
50	TOX			TOX			TOX			34,33	12,34	1,9
100	TOX			TOX			TOX			TOX		
Contr. Posit.	1094,00	22,63	3,1	1330,50	54,45	2,9	57,00	0,00	5,5	62,50	0,71	3,5
Resultado	ND						ND					

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, TOX – toxicidade para a linhagem teste

Observando-se os resultados obtidos, tanto no ponto situado em área de remanso (BJ1) como no ponto próximo à barragem (BJ2), não foi verificada atividade mutagênica com nenhuma das linhagens de *S.typhimurium* empregada. Por se tratar de local bastante contaminado com metais e compostos orgânicos (CETESB, 1995), estes resultados foram considerados, de certa forma, inesperados.

West *et al* (1986, 1988) estudando a genotoxicidade de sedimentos do Rio Black, no estado norte-americano de Ohio, mostraram que quando os extratos orgânicos das amostras de sedimento eram fracionados e estas frações eram testadas, as frações mutagênicas possuíam atividade genotóxica maior que a do extrato bruto. Os autores sugeriram que haviam compostos no extrato orgânico bruto que inibiam ou tinham atividade supressora da mutagenicidade. Grifoll *et al* (1990) atribuíram a ausência de correlação entre a composição química de extratos orgânicos de amostras de sedimento e sua atividade mutagênica a interações antagônicas entre os

componentes da mistura. Estudos específicos em sedimentos contaminados (Ho & Quinn, 1993) demonstraram variação da toxicidade quando os extratos foram obtidos com solventes orgânicos de polaridades diferentes. Abe & Urano (1994) mostraram a influência de substâncias presentes em amostras de sedimento coletadas no Japão, reduzindo a atividade genotóxica de compostos sabidamente mutagênicos, como 2-aminofluoreno e 2-nitrofluoreno.

Portanto, foi considerada a possibilidade de haver interações entre compostos presentes nas amostras que pudessem diminuir significativamente sua atividade mutagênica, ou possuir ações antagônicas. Para a verificação desta hipótese, foi realizado um fracionamento no extrato orgânico das amostras, de forma a separar frações de polaridades diferentes, com a expectativa de isolar compostos, ou grupos de compostos, que pudessem ter atividade mutagênica que não estivesse sendo detectada no extrato total.

A mutagenicidade de cada fração foi testada em dose única, devido à pouca quantidade de material resultante e os resultados obtidos nas frações dos extratos dos sedimentos BJ1 e BJ2 estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. A Tabela 6 apresenta os resultados de controle de qualidade (brancos) da extração do sedimento bruto e do fracionamento.

Tabela 4 – Resultados dos testes de Ames para as frações do extrato orgânico da amostra de sedimento BJ1, frente as linhagens TA98, TA100, TA104 e TA1537 de *S.typhimurium*, na presença e na ausência de S9

fr	Doses (mg sed. eq.)	TA98						TA100					
		-S9			+S9			-S9			+S9		
		Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
	Contr. Negat.	21,33	6,43		33,00	4,36		125,40	16,21		121,00	15,59	
1	142	31,00	1,41	1,5	30,50	7,78	0,9	131,67	7,57	1,1	123,67	5,51	1,0
2	246	26,00	5,29	1,2	30,00	4,24	0,9	130,67	6,66	1,0	125,00	13,86	1,0
3	125	29,33	6,66	1,4	35,50	0,71	1,1	130,67	9,07	1,0	168,33	20,50	1,4
4	183	28,00	5,66	1,3	28,00	6,56	0,9	180,50	27,58	1,4	178,50	38,89	1,5
5	120	19,67	4,93	0,9	29,33	7,77	0,9	134,00	18,52	1,1	117,67	9,29	1,0
6	166	23,00	0,00	1,1	33,00	4,36	1,0	142,00	6,24	1,1	150,33	3,79	1,2
	Contr. Posit.	323,00	86,27	15,1	753,00	19,80	22,8	1980,00	12,73	15,8	2266,50	144,96	18,7
fr	Doses (mg sed. eq.)	TA104						TA1537					
		-S9			+S9			-S9			+S9		
		Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
	Contr. Negat.	271,75	21,23	-	345,00	21,24	-	13,00	1,00	-	10,25	2,06	-
1	142	187,33	8,74	0,7	247,33	19,66	0,7	12,50	3,54	1,0	17,67	3,06	1,7
2	246	204,33	8,96	0,8	278,00	5,66	0,8	14,67	0,58	1,1	19,00	5,66	1,9
3	125	230,00	28,84	0,9	342,33	11,72	1,0	16,00	2,83	1,2	12,00	2,00	1,2
4	183	251,67	28,54	0,9	331,33	5,51	1,0	14,00	2,00	1,1	15,33	4,93	1,5
5	120	239,67	7,23	0,9	290,33	28,29	0,8	11,67	3,21	0,9	13,00	2,83	1,3
6	166	253,00	8,49	0,9	293,00	14,42	0,8	17,67	1,15	1,4	22,67	3,06	2,2
	Contr. Posit.	1107,50	44,55	4,1	1552,50	3,54	4,5	130,00	0,00	10,0	465,00	13,44	45,4

DP - desvio padrão, RM - razão de mutagenicidade

Não foi observada atividade mutagênica em nenhuma das frações do extrato orgânico do sedimento de Pirapora do Bom Jesus, BJ1, detectável com as linhagens de *Salmonella typhimurium* empregadas, nas doses testadas.

Devido aos valores de RM relativamente altos, foram realizados ainda dois experimentos com todas as frações frente à TA1537, empregando-se o dobro da concentração utilizada no primeiro experimento (dados não apresentados), e ainda assim não foi detectada atividade mutagênica.

Tabela 5 – Resultados dos testes de Ames para as frações do extrato orgânico da amostra de sedimento BJ2, frente às linhagens TA98, TA100, TA104 e TA1537 de *S.typhimurium*, na presença e na ausência de S9

fr	Doses (mg sed. eq.)	TA98						TA100					
		-S9			+S9			-S9			+S9		
		Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
	Contr. Negat.	32,40	6,58	-	33,75	6,55	-	196,80	12,07	-	229,33	12,86	-
1	83	34,33	1,09	1,5	32,67	1,53	1,0	152,67	19,55	0,8	192,33	10,96	0,8
2	68	28,00	4,36	0,9	29,33	2,08	0,9	155,00	12,77	0,8	211,00	3,61	0,9
3	75	34,67	2,89	1,1	32,67	2,89	1,0	183,33	12,06	0,9	304,67	54,35	1,3
4	86	31,33	2,89	1,0	39,00	6,00	1,2	161,33	10,60	0,8	204,67	11,06	0,9
5	47	31,33	4,51	1,0	36,67	5,13	1,1	164,67	19,55	0,8	208,33	15,31	0,9
6	78	40,33	4,04	1,2	53,33	4,04	1,6	214,00	33,51	1,1	196,00	35,59	0,9
	Contr. Posit.	466,00	39,6	14,4	343,00	32,53	10,2	1746,00	16,97	8,9	1068,50	205,77	4,7
fr	Doses (mg sed. eq.)	TA104						TA1537					
		-S9			+S9			-S9			+S9		
		Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
	Contr. Negat.	343,60	13,97	-	439,00	19,08	-	10,25	2,99	-	8,40	2,07	-
1	83	295,67	23,50	0,9	395,33	15,31	0,9	12,00	3,61	1,2	12,67	1,53	1,5
2	68	300,00	21,63	0,9	413,67	22,12	0,9	12,00	1,00	1,2	9,33	3,06	1,1
3	75	374,33	15,04	1,1	514,00	33,18	1,2	15,00	2,65	1,5	15,00	4,36	1,8
4	86	362,67	11,59	1,1	462,00	20,66	1,1	11,33	4,04	1,1	10,67	2,89	1,3
5	47	371,00	3,61	1,1	474,67	5,86	1,1	11,33	1,53	1,1	13,33	3,21	1,6
6	78	396,33	11,93	1,2	455,33	19,14	1,0	17,67	2,52	1,7	12,67	2,31	1,5
	Contr. Posit.	101,50	13,44	9,9	120,00	2,83	14,3	101,50	13,44	9,9	120,00	2,83	14,3

DP - desvio padrão, RM - razão de mutagenicidade

Novamente, não foi verificada atividade mutagênica nas frações do extrato bruto da amostra de Pirapora do Bom Jesus, BJ2, detectável com as linhagens de *Salmonella typhimurium* empregadas, nas doses testadas.

Da mesma forma que no ponto BJ1, outros dois experimentos com as frações do extrato do ponto BJ2 foram realizados frente a linhagem TA1537, empregando-se o dobro da concentração utilizada no primeiro experimento (dados não apresentados), e ainda assim não foi detectada atividade mutagênica, confirmando o resultado negativo do experimento inicial.

Concluimos que as duas amostras coletadas no Reservatório de Pirapora do Bom Jesus apresentaram resultados negativos para o teste de Ames, para todas as linhagens empregadas, mesmo após fracionamento. Desta forma, optou-se pela utilização de outro local para testar e comparar métodos de preparo de amostra, extração e sensibilidade das linhagens do teste de Ames.

Tabela 6 – Resultados dos testes de Ames para os brancos do extrato bruto (Br) e frações, frente às linhagens TA98, TA100, TA102 e TA1537 de *S.typhimurium*, na presença e na ausência de S9

fr	Doses	TA98						TA100						
		-S9			+S9			-S9			+S9			
		Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	
br	Contr. Negat.	41,25	3,20	-	43,67	9,02	-	114,60	14,38	-	157,00	6,00	-	
	100µL	37,33	14,57	0,9	52,00	8,19	1,2	129,50	2,12	1,1	137,67	20,40	0,9	
	1	100µL	41,00	6,56	1,0	45,67	10,07	1,0	160,50	27,58	1,4	135,00	15,10	0,9
	2	50µL	44,67	3,21	1,1	50,50	0,71	1,2	153,67	11,37	1,3	202,50	12,02	1,3
	3	50µL	45,67	5,13	1,1	54,00	5,66	1,2	168,33	15,95	1,5	201,33	5,03	1,3
	4	50µL	52,33	11,06	1,3	64,33	5,13	1,5	144,50	0,71	1,3	216,00	0,00	1,4
	5	50µL	44,33	3,06	1,1	50,33	5,03	1,2	156,33	12,66	1,4	235,00	0,00	1,5
6	50µL	46,50	2,12	1,1	54,00	6,93	1,2	154,00	0,00	1,3	195,00	14,14	1,2	
fr	Doses	TA102						TA1537						
		-S9			+S9			-S9			+S9			
		Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	
br	Contr. Negat.	400,00	30,79	-	390,60	14,98	-	9,60	3,58	-	11,20	2,77	-	
	100µL	409,00	35,36	1,0	480,50	23,33	1,2	12,00	2,65	1,3	11,67	2,52	1,0	
	1	100µL	436,67	43,88	1,1	499,00	14,11	1,3	14,00	3,00	1,5	10,00	1,73	0,9
	2	50µL	418,00	25,24	1,0	465,33	11,68	1,2	9,00	3,00	0,9	12,67	1,53	1,1
	3	50µL	435,67	17,01	1,1	469,67	23,46	1,2	7,00	1,73	0,7	11,00	2,83	1,0
	4	50µL	412,00	2,65	1,0	457,33	33,26	1,2	14,67	1,15	1,5	13,33	4,73	1,2
	5	50µL	419,00	25,46	1,0	478,67	32,01	1,2	8,33	4,04	0,9	17,00	4,24	1,5
6	50µL	427,00	19,08	1,1	460,67	26,63	1,2	11,00	0,00	1,1	9,50	0,71	0,8	

DP - desvio padrão, RM - razão de mutagenicidade

5.1.2 CUBATÃO / BAIXADA SANTISTA

Os resultados das análises de genotoxicidade realizadas no extrato orgânico bruto do sedimento coletado em Cubatão, no ponto sob influência do despejo de efluentes da COSIPA estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no ponto de descargas de efluente da COSIPA, em Cubatão, frente as linhagens TA98, TA1538, TA100 e TA1535 de *S.typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Doses (mg sed. eq.)	TA98						TA1538					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	60,20	7,46		66,20	6,50		12,60	2,30		10,80	5,31	
1	57,70	7,51	1,0	112,00	8,19	1,7**	8,70	2,52	0,7	11,67	0,58	1,1
10	TOX			223,00	9,54	3,4**	TOX			9,67	1,15	0,9
100	TOX			TOX			TOX			TOX		
Contr. Posit.	619,50	36,06	10,3	687,50	68,59	10,4	219,00	19,80	17,4	54,00	8,49	5,0
Resultado	POSITIVO						ND					
Doses (mg sed. eq.)	TA100						TA1535					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	82,60	11,33		90,00	13,19		14,40	3,44		11,40	1,82	
1	68,33	3,06	0,8	96,33	4,73	1,1	17,30	3,51	1,2	15,33	2,52	1,3
10	71,33	21,73	0,9	251,00	39,51	2,8**	TOX			10,67	0,58	0,9
100	63,00	4,24	0,8	135,00	2,83	1,5	TOX			TOX		
Contr. Posit.	700,50	17,68	8,5	543,50	30,41	6,0	45,00	9,90	3,1	460,50	33,23	40,4
Resultado	POSITIVO						ND					

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, TOX – toxicidade para a linhagem teste, * p<0,05, ** p<0,01

Os ensaios realizados com o extrato orgânico bruto da amostra coletada no ponto influenciado pelos efluentes da COSIPA, em Cubatão, demonstram a presença de atividade mutagênica nesta amostra, detectável com as 4 linhagens de *S.typhimurium* empregadas. Os resultados mostram que há grandes quantidades de substâncias tóxicas no extrato bruto, o que se verifica com a drástica diminuição do crescimento de “background” em concentrações acima de 1 mg equivalente de sedimento por placa para as linhagens TA98, TA1538 e TA1535 de *Salmonella typhimurium*. Esta toxicidade foi consideravelmente reduzida na presença de mistura S9, sugerindo que parte dos compostos tóxicos tenha sido biotransformada. Este tipo de resultado foi obtido por Maccubin *et al* (1991), quando estudaram a mutagenicidade de sedimentos coletados em 30 diferentes sítios do Rio Detroit, nos Estados Unidos. Estes autores também verificaram que, na ausência de ativação metabólica, as amostras de sedimento eram pouco ou não mutagênicas, assim como pode ser observado na Tabela 7.

A partir deste resultado positivo, foi realizada nova coleta no mesmo local e no Rio Piaçaguera, para as comparações entre o uso de diferentes solventes.

5.1.2.1 Avaliação de solventes para extração orgânica

Os resultados da comparação entre combinações diferentes de solventes utilizados na extração orgânica das amostras de sedimento coletadas na primeira campanha estão apresentados nas Tabelas 8 e 9, e nas figuras 9 a 11.

Tabela 8 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Ponto C (1a. campanha), extraído com DCM/metanol e com DCM/acetona, frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Ponto C 1ª Campanha	extração com DCM/metanol											
	TA98						TA100					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
Doses (mg sed. eq.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	61,00	4,24	-	66,60	8,02	-	115,20	12,28	-	100,80	11,58	-
1	217,00	16,64**	3,6	191,67	14,29**	2,9	170,33	7,51**	1,5	277,33	74,90*	2,8
5	216,67	39,50**	3,6	269,50	24,75**	4,0	107,33	17,56	0,9	146,00	34,39	1,4
10	709,33	79,88**	11,6	463,67	49,08**	7,0	275,67	16,50**	2,4	499,00	82,02**	5,0
50	1428,0	78,35**	23,4	1066,3	51,98**	16,0	335,00	64,97**	2,9	308,33	58,45**	3,1
100	1402,0	88,64**	23,0	1311,0	62,75**	19,7	416,50	37,48**	3,6	343,00	81,63*	3,4
Contr. Posit.	554,00	15,65	9,1	1173,5	2,12	17,6	879,50	152,03	14,4	580,50	48,79	5,8
Doses (mg sed. eq.)	extração com DCM/acetona											
	TA98						TA100					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
Doses (mg sed. eq.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	61,00	4,24	-	66,60	8,02	-	115,20	12,28	-	100,80	11,58	-
1	187,33	12,66**	3,1	181,67	38,18*	2,7	129,67	31,94	1,1	154,00	16,52*	1,5
5	271,33	69,04*	4,4	465,00	33,94**	7,0	128,00	26,15	1,1	179,00	46,67	1,8
10	846,33	28,57**	13,9	780,33	30,92**	11,7	373,00	176,78	3,2	621,00	118,95**	6,2
50	1430,3	249,42**	23,4	1435,0	34,87**	21,5	271,33	49,03*	2,4	647,00	93,18**	6,4
100	1078,3	32,81**	17,7	1433,3	30,09**	21,5	346,33	21,55**	3,0	434,00	76,27**	4,3
Contr. Posit.	554,00	15,65	9,1	1173,5	2,12	17,6	879,50	152,03	7,6	580,50	48,79	5,8

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01

Verifica-se que há atividade genotóxica nesta amostra, independentemente dos solventes utilizados para extração orgânica, detectável com as duas linhagens de *Salmonella typhimurium* empregadas, tanto na presença como na ausência de ativação metabólica.

Tabela 9 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Rio Piaçaguera (1a. campanha), extraído com DCM/metanol e DCM/acetona, frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

R. Piaçaguera 1ª Campanha	extração com DCM/metanol											
	TA98						TA100					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
Doses (mg sed. eq.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	61,00	4,24	-	66,60	8,02	-	115,20	12,28	-	100,80	11,58	-
1	88,67	20,31	1,5	82,00	13,23	1,2	149,67	5,77*	1,3	156,33	11,72**	1,6
5	117,00	7,55**	1,9	100,50	9,19*	1,5	161,67	13,58*	1,4	185,50	16,26**	1,8
10	126,00	12,12**	2,1	93,50	0,71*	1,4	175,00	12,53**	1,5	174,00	2,00**	1,7
50	TOX			155,67	21,59**	2,3	TOX			TOX		
100	TOX			233,67	42,71**	3,5	TOX			TOX		
Contr. Posit.	554,00	15,65	9,1	1173,5	2,12	17,6	879,50	152,03	7,6	580,50	48,79	5,8
R. Piaçaguera 1ª Campanha	extração com DCM/acetona											
	TA98						TA100					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
Doses (mg sed. eq.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	61,00	4,24	-	66,60	8,02	-	115,20	12,28	-	100,80	11,58	-
1	86,00	7,00*	1,4	82,67	7,57	1,2	137,50	0,71	1,2	168,67	3,21**	1,7
5	-	-	-	82,00	6,08	1,2	151,00	4,24*	1,3	208,33	16,74**	2,1
10	73,00	11,31	1,2	86,67	8,33	1,3	157,00	7,00*	1,4	206,67	18,58**	2,1
50	83,50	6,36*	1,4	150,00	13,08**	2,3	149,33	9,61*	1,3	223,50	9,19**	2,2
100	117,67	10,02**	1,9	194,33	9,61**	2,9	125,67	21,39	1,1	217,33	7,02**	2,2
Contr. Posit.	554,00	15,65	9,1	1173,5	2,12	17,6	879,50	152,03	7,6	580,50	48,79	5,8

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, TOX – toxicidade para a linhagem teste, * p<0,05, ** p<0,01

Os resultados obtidos com o sedimento coletado no Rio Piaçaguera indicam a presença de compostos genotóxicos neste local, detectáveis principalmente com a linhagem TA98, tanto na presença como na ausência de ativação metabólica.

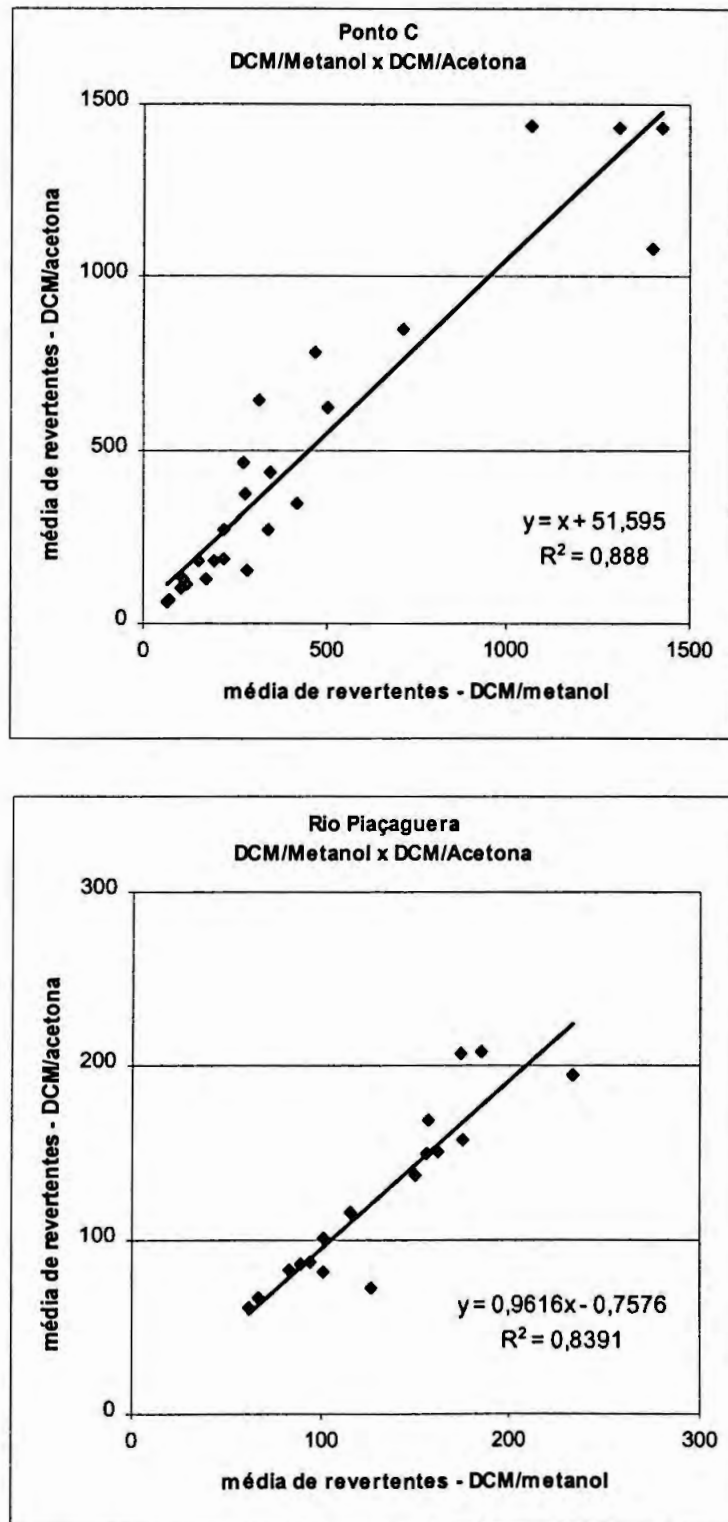


Figura 9 – Retas de regressão comparando os solventes utilizados na extração orgânica dos sedimentos coletados no Ponto C e no Rio Piaçaguera

Os resultados dos testes realizados visando a comparação entre duas combinações de solventes, DCM/metanol e DCM/acetona, mostram pouca diferença entre eles. O diclorometano é um solvente considerado apropriado para a extração de um espectro grande de compostos (Papoulias *et al*, 1996; Malachova, 1999) e a adição de metanol incrementa a extração de compostos polares que podem ser responsáveis por uma certa parcela da mutagenicidade (Marvin *et al*, 2000).

Verificou-se, também, durante estes experimentos, que a acetona causa o resfriamento do material utilizado, podendo ser responsável pela quebra de vidraria, além de ser um reagente de aquisição mais difícil. Desta forma, decidiu-se utilizar a primeira combinação, por ser na prática mais apropriada.

5.1.2.2 Avaliação de metodologias de Teste de Ames

Os resultados da comparação entre os ensaios de incorporação em placas e pré-incubação dos extratos das amostras de sedimento coletadas na primeira campanha estão apresentados nas Tabelas 10 e 11, e na figura 10.

Tabela 10 - Resultados dos testes de Ames, Incorporação em Placas e Pré-Incubação, para o sedimento coletado no Ponto C (1a. campanha), extraído com DCM/metanol, frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Ponto C 1ª Campanha	Incorporação em Placas											
	TA98						TA100					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
Doses (mg sed. eq.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	26,00	4,30	-	33,20	3,27	-	122,00	18,74	-	139,75	17,29	-
0,05	20,67	1,53	0,8	25,60	4,16	0,8	103,00	9,85	0,8	128,33	4,62	0,9
0,10	19,67	4,73	0,8	21,00	5,00	0,6	82,33	9,50	0,7	109,67	4,16	0,8
0,20	26,67	8,14	1,0	22,67	3,21	0,7	123,00	0,00	1,0	157,00	13,86	1,1
0,50	34,33	3,06	1,3	30,67	3,06	0,9	167,33	16,74	1,4	205,00	19,80*	1,5
1,00	50,00	3,46**	1,9	49,00	1,41**	1,5	194,67	39,88	1,6	210,33	15,37*	1,5
2,00	130,00	19,00**	5,0	61,33	4,04**	1,8	279,00	7,21**	2,3	300,67	42,72**	2,2
Contr. Posit.	475,50	3,53	18,3	123,00	1,41	3,7	1565,50	7,78	12,8	557,50	133,64	4,0
Doses (mg sed. eq.)	Pré-Incubação											
	TA98						TA100					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
Contr. Negat.	30,80	7,92	-	30,20	8,26	-	134,60	11,37	-	154,00	17,05	-
0,05	27,33	0,58	0,9	21,33	1,15	0,7	129,67	1,53	1,0	137,33	12,06	0,9
0,10	25,00	4,00	0,8	24,00	1,73	0,8	104,67	3,51	0,8	130,67	9,07	0,8
0,20	38,67	2,52	1,3	41,00	6,56	1,4	163,33	6,35*	1,2	187,00	14,14	1,2
0,50	56,67	4,16**	1,8	38,67	3,06	1,3	234,67	9,50**	1,7	254,67	18,18**	1,7
1,00	55,67	6,11*	1,8	46,00	2,00	1,5	207,00	2,65**	1,5	-	-	-
2,00	101,00	14,18**	3,3	68,67	7,51**	2,3	387,67	30,07**	2,9	348,00	16,97**	2,3
Contr. Posit.	446,50	26,16	14,5	275,00	12,73	9,1	1947,00	144,25	14,5	1261,5	57,27	8,2

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01

Tabela 11 – Resultados dos testes de Ames, Incorporação em Placas e Pré-Incubação, para o sedimento coletado no Rio Piaçaguera (1a. campanha), extraído com DCM/metanol, frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

R.Piaçaguera 1ª Campanha	Incorporação em Placas											
	TA98						TA100					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
Doses (mg sed. eq.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	26,00	4,30	-	33,20	3,27	-	122,00	18,74	-	139,75	17,29	-
0,05	25,67	2,31	1,0	34,00	5,00	1,0	122,33	2,08	1,0	148,67	18,90	1,1
0,10	31,33	7,09	1,2	25,33	1,15	0,8	112,00	5,29	0,9	140,33	6,11	1,0
0,20	29,00	4,58	1,1	27,33	4,04	0,8	129,00	11,27	1,1	158,00	3,46	1,1
0,50	31,67	6,51	1,2	31,00	6,08	0,9	155,33	6,03	1,3	180,00	8,49	1,3
1,00	30,67	8,02	1,2	33,00	4,24	1,0	144,00	10,58	1,2	158,00	11,31	1,1
2,00	48,67	4,04**	1,9	41,67	1,53*	1,3	146,67	6,66	1,2	192,00	14,14**	1,4
Contr. Posit.	475,50	3,53	18,3	123,00	1,41	3,7	1565,50	7,78	12,8	557,00	133,64	4,0
Doses (mg sed. eq.)	Pré-Incubação											
	TA98						TA100					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
Doses (mg sed. eq.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	30,80	7,92	-	30,20	8,26	-	134,60	11,37	-	154,00	17,05	-
0,05	31,33	7,51	1,0	28,50	2,12	0,9	149,00	16,52	1,1	150,50	14,85	1,0
0,10	26,00	4,00	0,8	33,67	11,85	1,1	118,33	12,5	0,9	136,33	15,63	0,9
0,20	37,00	10,39	1,2	35,33	2,31	1,2	156,67	3,21	1,2	167,50	14,85	1,1
0,50	31,33	4,04	1,0	29,33	2,31	1,0	154,00	4,24	1,1	210,00	1,41*	1,4
1,00	38,67	3,79	1,3	39,33	6,43	1,3	160,67	7,37	1,2	173,00	9,90	1,1
2,00	47,00	11,53	1,5	48,67	8,08	1,6	179,33	3,06**	1,3	263,00	17,69**	1,7
Contr. Posit.	446,50	26,16	14,5	275,00	12,73	9,1	1947,00	144,25	14,5	1261,5	57,27	8,2

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagénica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01

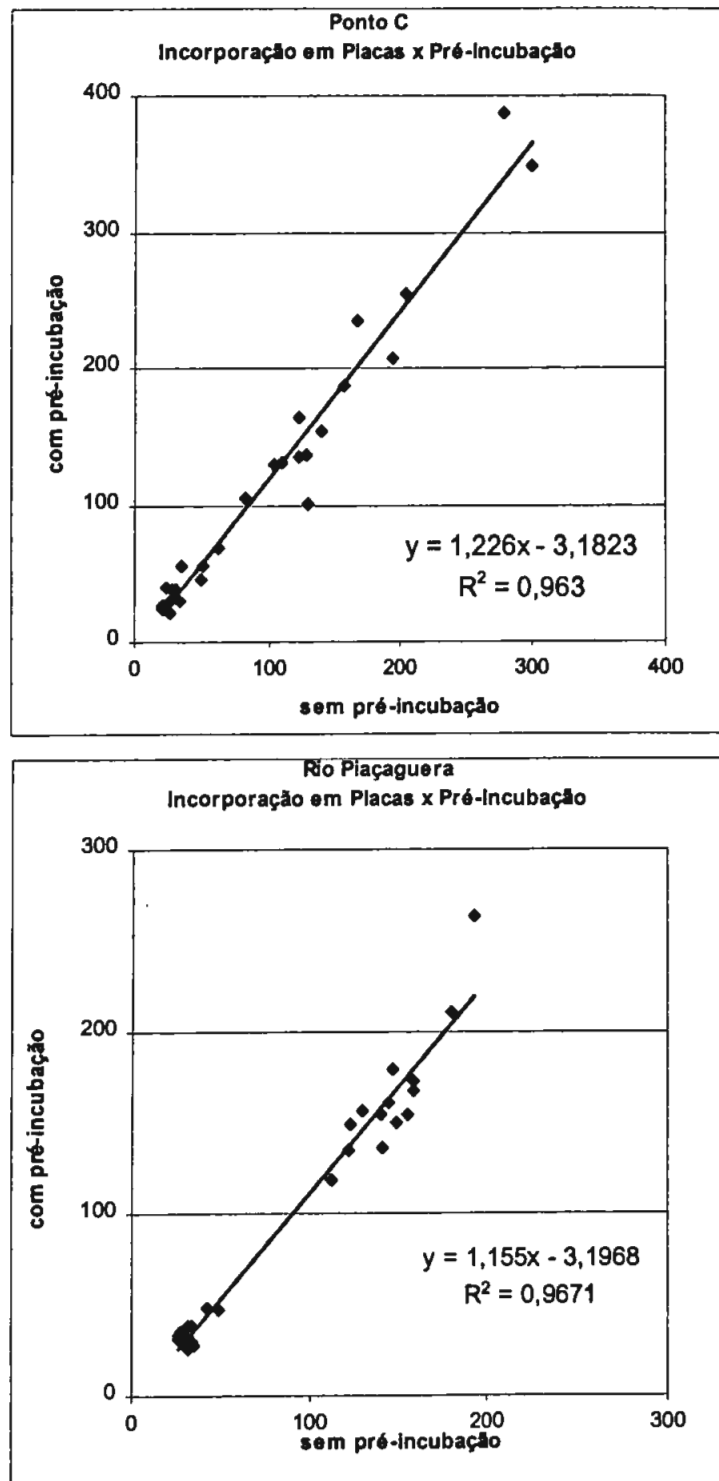


Figura 10 - Retas de regressão comparando as metodologias de teste de Ames: Incorporação em Placas e Pré-Incubação

De acordo com Maron & Ames (1983), o teste com pré-incubação pode ser utilizado rotineiramente, ou quando os resultados do teste de incorporação em placas são inconclusivos.

De Marini *et al* , 1981, analisaram o condensado de fumaça de cigarro total e dez frações, com as duas metodologias em paralelo, incorporação em placas e pré-incubação, utilizando a linhagem TA1538, na presença e na ausência de ativação metabólica. Os pesquisadores não observaram diferença significativa entre os dois métodos.

Segundo Gatehouse *et al* (1994), nitrosaminas alifáticas de cadeias curtas, metais divalentes, aldeídos, corantes tipo azo, alguns alcalóides, e nitrocompostos são mais eficientemente detectados usando-se o procedimento de pré-incubação. Os autores, no entanto, apontaram não haver dados suficientes para justificar a preferência por um ou outro método.

Os trabalhos de avaliação da contaminação com compostos genotóxicos em amostras de sedimento mostram que tanto uma quanto outra metodologia são utilizadas, sem que nenhum dos autores demonstre a melhor eficácia de uma ou de outra. Grifoll *et al* (1990) e Fernandez *et al* (1992) utilizaram a pré-incubação em ensaios de mutagenicidade combinados a análises químicas das frações dos extratos orgânicos obtidos de amostras de sedimentos do rio Besós, em Barcelona, Espanha. Outros autores utilizam o método padrão de incorporação em placas (Metcalf *et al*, 1990, Maccubbin *et al*, 1991, Marvin *et al*, 1993).

Em nosso estudo, os resultados da comparação entre os dois métodos, incorporação em placas e pré-incubação, mostram pouca diferença, indicando que qualquer um deles poderia ser usado. Pela sua maior facilidade técnica, optamos pela incorporação em placas.

5.1.2.3 Avaliação de procedimentos de preparo de amostra

Os resultados das campanhas 2, 3 e 4 estão apresentados nas Tabelas 12 a 38.

Tabela 12 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Ponto C (2a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído *in natura*

Ponto C - 2a. Camp.	SEDIMENTO IN NATURA					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	30,00	2,35	-	30,20	3,83	-
0,05	42,00	2,65**	1,4	56,00	9,90**	1,9
0,10	50,67	7,02*	1,7	64,67	2,08**	2,1
0,20	43,33	4,16*	1,4	78,00	9,54**	2,6
0,50	57,67	8,08**	1,9	141,30	6,66**	4,7
1,00	68,00	10,54**	2,3	156,67	13,28**	5,2
2,00	69,33	10,07**	2,3	118,67	14,84*	3,9
5,00	65,00	4,58**	2,2	-	-	-
Contr. Posit.	660,00	8,48	22,0	110,00	16,97	3,6
RESULTADO rev/g equiv.	210.000 (150.000-280.000)***			230.000 (210.000-250.000)		
Ponto C - 2a. Camp.	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	143,00	16,66	-	135,60	12,99	-
0,05	172,67	12,22	1,2	199,33	14,43**	1,5
0,10	175,67	15,95	1,2	246,00	13,23**	1,8
0,20	169,00	9,54	1,2	270,33	17,67**	2,0
0,50	188,33	5,51*	1,3	227,33	25,11**	1,7
1,00	227,67	11,59**	1,6	266,67	13,32**	2,0
2,00	264,00	15,59**	1,8	287,50	12,02**	2,1
5,00	260,33	11,24**	1,8	254,33	4,04**	1,9
Contr. Posit.	1737,50	269,41	12,2	246,50	65,76	1,8
RESULTADO rev/g equiv.	59.000 (50.000-68.000)			140.000 (120.000-160.000)		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, * p<0,05, ** p<0,01, *** intervalo de confiança 90%

Tabela 13 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Ponto C (2a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído seco

Ponto C - 2a. Camp.	SEDIMENTO SECO					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	32,60	8,20	-	30,20	3,83	-
0,05	45,00	6,08	1,4	43,00	2,00*	1,4
0,10	49,67	3,21	1,5	49,60	3,79**	1,6
0,20	45,00	6,56	1,4	51,00	7,00**	1,7
0,50	51,00	7,00	1,6	76,00	17,58*	2,5
1,00	50,67	13,20	1,6	101,33	12,50**	3,4
2,00	64,67	3,06**	2,0	100,00	15,56**	3,3
Contr. Posit.	516,50	78,49	15,8	110,00	16,97	3,6
RESULTADO rev/g equiv.	14.000 (8.500-19.000)***			74.000 (63.000-86.000)		
Ponto C - 2a. Camp.	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	101,40	5,41	-	106,40	7,83	-
0,05	142,33	15,27**	1,4	152,67	9,71**	1,4
0,10	131,67	3,21**	1,3	185,00	2,65**	1,7
0,20	136,33	7,77**	1,3	192,00	16,52**	1,8
0,50	175,00	2,65**	1,7	212,00	6,08**	2,0
1,00	221,00	14,53**	2,2	251,33	12,66**	2,4
2,00	254,00	23,26**	2,5	485,00	70,89**	4,6
Contr. Posit.	2356,00	8,48	23,2	508,50	36,06	4,8
RESULTADO rev/g equiv.	150.000 (120.000-170.000)			160.000 (130.000-160.000)		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, * p<0,05, ** p<0,01, *** intervalo de confiança 90%

Tabela 14 – Resultados dos testes de Ames do extrato do “pellet” resultante da centrifugação do sedimento coletado no Ponto C (2a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Ponto C - 2a. Camp.	PELLET					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	37,60	5,43	-	26,80	5,54	-
0,05	32,00	6,00	0,9	37,33	3,06	1,4
0,10	32,00	1,41	0,9	45,67	6,51*	1,7
0,20	29,00	5,29	0,8	49,00	5,00*	1,8
0,50	37,00	11,31	1,0	67,00	18,38*	2,5
1,00	43,00	3,46	1,1	85,00	9,00**	3,2
2,00	62,67	7,23*	1,7	96,50	0,71**	3,6
Contr. Posit.	515,00	63,64	13,7	1792,50	61,52	66,9
RESULTADO rev/g equiv.	13.000 (9.200-18.000)***			61.000 (50.000-72.000)		
Ponto C - 2a. Camp.	TA100					
	-S9			+S9		
	Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP
Contr. Negat.	130,20	14,38	-	112,60	5,18	-
0,05	150,33	5,77	1,2	161,33	13,65**	1,4
0,10	176,67	7,37*	1,4	175,00	6,24**	1,6
0,20	147,67	23,16	1,1	188,00	7,21**	1,7
0,50	208,33	15,50**	1,6	254,67	37,29**	2,3
1,00	228,00	1,00**	1,8	264,67	29,57**	2,4
2,00	247,67	25,54**	1,9	399,67	126,87*	3,5
Contr. Posit.	1960,00	49,5	15,1	456,50	14,85	4,1
RESULTADO rev/g equiv.	140.000 (99.000-180.000)			290.000 (220.000-360.000)		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, * p<0,05, ** p<0,01, *** intervalo de confiança 90%

Tabela 15 – Resultados dos testes de Ames do extrato da água intersticial do sedimento coletado no Ponto C (2a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Ponto C - 2a. Camp.	ÁGUA INTERSTICIAL					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	28,00	6,89	-	30,20	3,83	-
5	35,67	7,37	1,3	44,33	5,03*	1,5
10	50,33	3,21*	1,8	57,33	6,43**	1,9
20	39,33	4,93	1,4	63,33	6,66**	2,1
50	69,00	10,54**	2,5	110,33	8,08**	3,7
100	48,00	7,55*	1,7	130,00	14,11**	4,3
Contr. Posit.	660,00	8,49	23,6	110,00	16,97	3,6
RESULTADO rev/g equiv.	760 (550-980)***			1.600 (1.400-1.800)		
Ponto C - 2a. Camp.	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	145,50	15,93	-	141,40	17,11	-
5	191,67	6,66*	1,3	256,67	14,84**	1,8
10	190,50	3,54*	1,3	261,00	14,14**	1,8
50	271,67	4,73**	1,9	443,67	27,43**	3,1
100	271,67	9,45**	1,9	483,00	11,00**	3,4
500	243,00	17,52**	1,7	543,00	39,89**	3,8
Contr. Posit.	1757,00	65,05	12,1	436,50	10,61	3,1
RESULTADO rev/g equiv.	1.200 (990-1.400)			580 (-)		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, * p<0,05, ** p<0,01, *** intervalo de confiança 90%

Verificamos que, no Ponto C, os resultados obtidos com a amostra de sedimento coletada na segunda campanha do nosso estudo, indicam a presença de alta atividade genotóxica, detectável com as duas linhagens utilizadas, independentemente da presença de ativação metabólica. A genotoxicidade associada ao material particulado (Tabelas 12 a 14), verificada pelo cálculo das potências dos extratos testados, encontra-se na ordem de 10^4 a 10^5 revertentes por grama de sedimento equivalente. As potências encontradas na avaliação da atividade genotóxica da água intersticial do sedimento foram menores, variando entre 10^2 e 10^3 revertentes por grama de sedimento equivalente (Tabela 15).

Tabela 16 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Rio Piaçaguera (2a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído *in natura*

R. Piaçaguera - 2a. Camp.	SEDIMENTO IN NATURA					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	30,00	2,35	-	40,00	6,36	-
10	47,00	6,93	1,6	47,33	6,43	1,2
50	35,00	3,61	1,2	43,67	10,97	1,1
100	45,33	3,51**	1,5	52,00	9,00	1,3
500	33,67	6,35	1,1	40,67	4,04	1,0
Contr. Posit.	561,00	36,77	18,7	1080,50	21,92	27,0
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		
R. Piaçaguera - 2a. Camp.	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	143,00	16,66	-	135,60	12,99	-
10	155,00	2,65	1,1	163,33	20,74	1,2
50	156,00	3,61	1,1	161,67	9,24	1,2
100	131,00	3,61	0,9	177,00	12,29*	1,3
500	108,00	7,94	0,8	129,00	6,00	1,0
Contr. Posit.	1737,50	269,41	12,2	246,50	65,76	1,8
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01

Tabela 17 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Rio Piaçaguera (2a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído seco

R. Piaçaguera - 2a. Camp.	SEDIMENTO SECO					
	TA98					
Doses (mg equiv.)	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	39,60	4,98	-	38,60	5,41	-
5	46,67	3,79	1,2	37,00	7,81	1,0
10	58,67	9,02	1,5	85,00	10,53**	2,2
20	70,00	6,00**	1,8	70,00	6,24**	1,8
50	69,00	13,89*	1,7	91,67	10,02**	2,4
100	96,67	13,58*	2,4	92,67	1,53**	2,4
Contr. Posit.	502,50	50,20	12,7	169,00	7,07	4,4
RESULTADO rev/g equiv.	1.600 (1.100-2.100)***			1.500 (1.000-2.000)		
Doses (mg equiv.)	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	101,40	5,41	-	106,40	7,83	-
10	135,33	17,50	1,3	157,34	14,19	1,5
20	112,00	5,00	1,1	124,33	1,53*	1,2
50	129,33	4,04**	1,3	177,33	17,04**	1,7
100	138,67	5,69**	1,4	162,00	7,94**	1,5
Contr. Posit.	2356,00	8,48	23,2	508,50	36,06	4,8
RESULTADO rev/g equiv.	ND			640 (510-760)		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01, *** intervalo de confiança 90%

Tabela 18 – Resultados dos testes de Ames do extrato do pellet resultante da centrifugação do sedimento coletado no Rio Piaçaguera (2a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

R. Piaçaguera - 2a. Camp.	PELLET					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	28,00	6,89	-	30,20	3,83	-
1	41,60	4,93	1,5	54,33	10,41*	1,8
5	51,33	3,06*	1,8	61,33	12,58*	2,0
10	39,50	0,71	1,4	66,00	13,86*	2,2
20	45,00	2,00*	1,6	69,00	7,55**	2,3
50	46,33	2,52*	1,7	74,00	2,65**	2,5
Contr. Posit.	493,00	14,14	17,6	169,00	7,07	5,6
RESULTADO rev/g equiv.	4.700 (3.100-6.300)***			6.400 (4.300-8.400)		
R. Piaçaguera - 2a. Camp.	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	130,20	14,38	-	112,60	5,18	-
1	162,00	10,82	1,2	129,67	9,71	1,2
5	156,33	10,21	1,2	142,00	8,72*	1,3
10	155,00	9,00	1,2	147,67	5,69**	1,3
20	161,00	4,00*	1,2	170,00	18,08*	1,5
50	133,00	15,10	1,0	188,33	9,07**	1,7
100	118,00	14,00	0,9	143,67	14,29*	1,3
Contr. Posit.	1960,00	49,50	15,1	456,50	14,85	4,1
RESULTADO rev/g equiv.	ND			2.700 (2.100-3.300)		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01, *** intervalo de confiança 90%

Tabela 19 – Resultados dos testes de Ames do extrato da água intersticial do sedimento coletado no Rio Piaçaguera (2a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

R. Piaçaguera - 2a. Camp.	ÁGUA INTERSTICIAL					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	23,80	3,27	-	29,00	4,30	-
25	27,00	8,72	1,1	22,33	5,03	0,8
50	21,33	3,51	0,9	32,67	4,93	1,1
100	30,00	4,36	1,3	32,00	6,00	1,1
250	24,00	6,24	1,0	33,67	1,15	1,2
500	31,33	10,60	1,3	42,00	7,81	1,4
Contr. Posit.	493,00	14,14	20,7	114,50	21,92	3,9
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		
R. Piaçaguera - 2a. Camp.	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	145,50	15,93	-	141,40	17,11	-
5	156,00	7,07	1,1	147,00	13,08	1,0
10	144,00	18,33	1,0	144,33	6,66	1,0
50	149,00	19,80	1,0	157,33	12,42	1,1
100	167,67	9,29	1,2	182,33	8,62*	1,3
500	167,00	12,29	1,1	152,67	10,97	1,1
Contr. Posit.	1757,00	65,05	12,1	436,50	10,61	3,1
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01

A amostra coletada no Rio Piaçaguera na segunda campanha deste estudo, mostrou a presença de compostos com atividade genotóxica, com potências menores que as encontradas para o sedimento coletado no Ponto C. Esta atividade foi detectada quando a água foi retirada da amostra, na extração do sedimento seco e do pellet (Tabelas 17 e 18), e não foi observada quando o sedimento foi extraído *in natura*, tampouco na água intersticial (Tabelas 16 e 19). Verifica-se também que a atividade mutagênica não foi detectada com a linhagem TA100, na ausência de S9, indicando a ausência da atividade de mutágenos diretos responsáveis pela substituição de pares de base do DNA.

Tabela 20 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Ponto C (3a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído *in natura*

Ponto C - 3a. Camp.	SEDIMENTO IN NATURA						
	TA98						
	Doses (mg equiv.)	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM	
Contr. Negat.	26,50	1,00	-	26,20	5,89	-	
0,05	31,67	0,58	1,2	39,67	5,13	1,5	
0,10	29,00	8,19	1,1	28,00	11,27	1,1	
0,20	32,33	5,51	1,2	34,67	1,53	1,3	
0,50	34,00	3,46*	1,3	52,33	11,02*	2,0	
1,00	39,33	2,08**	1,5	61,33	1,15**	2,3	
2,00	43,00	10,54	1,6	74,97	6,51**	2,9	
5,00	72,67	5,13**	2,7	87,67	4,73**	3,3	
Contr. Posit.	504,00	2,83	19,0	527,50	99,70	20,1	
RESULTADO rev/g equiv.	8.700 (6.900-11.000)***			28.000 (22.000-33.000)			
Ponto C - 3a. Camp.	TA100						
	Doses (mg equiv.)	-S9			+S9		
		Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	143,00	16,66	-	134,20	12,99	-	
0,05	156,33	20,53	1,1	154,00	11,27	1,1	
0,10	140,67	8,08	1,0	159,00	5,29	1,2	
0,20	135,00	5,20	0,9	163,67	13,01	1,2	
0,50	139,67	6,81	1,0	181,00	34,22	1,3	
1,00	154,00	2,00	1,1	187,00	44,64	1,4	
2,00	171,67	17,04	1,2	229,33	26,76**	1,7	
5,00	175,67	14,36	1,2	244,00	41,07**	1,8	
Contr. Posit.	1735,50	269,41	12,1	246,50	65,76	1,8	
RESULTADO rev/g equiv.	ND			22.000 (16.000-29.000)			

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01, *** intervalo de confiança 90%

Tabela 21 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Ponto C (3a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído seco

Ponto C - 3a. Camp.	SEDIMENTO SECO					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	26,50	1,00	-	26,00	5,92	-
0,05	24,00	4,00	0,9	29,50	0,71	1,1
0,10	23,00	2,83	0,9	34,33	4,73	1,3
0,20	25,33	3,51	1,0	43,67	8,08	1,7
0,50	38,67	10,79	1,5	52,33	3,21**	2,0
1,00	46,00	3,46**	1,7	76,33	5,51**	2,9
2,00	54,00	15,87	2,0	79,33	10,79**	3,1
Contr. Posit.	504,00	2,83	19,0	527,20	99,70	20,3
RESULTADO rev/g equiv.	17.000 (12.000-21.000)***			51.000 (42.000-60.000)		
Ponto C - 3a. Camp.	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	101,40	5,41	-	106,40	7,83	-
0,05	134,00	11,14*	1,3	136,00	6,24*	1,3
0,10	139,67	13,58*	1,4	160,67	24,66*	1,5
0,20	156,33	10,60**	1,5	186,67	3,79**	1,8
0,50	166,67	10,02**	1,6	262,33	27,21**	2,5
1,00	201,33	5,69**	2,0	287,33	17,62**	2,7
2,00	223,33	24,01**	2,2	424,33	60,78**	4,0
Contr. Posit.	2356,00	8,48	23,2	508,50	36,06	4,8
RESULTADO rev/g equiv.	290.000 (220.000-350.000)			320.000 (270.000-370.000)		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, * p<0,05, ** p<0,01, *** intervalo de confiança 90%

Tabela 22 – Resultados dos testes de Ames do extrato do pellet resultante da centrifugação do sedimento coletado no Ponto C (3a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Ponto C - 3a. Camp.	PELLET					
	TA98					
	Doses (mg equiv.)	-S9			+S9	
Média		DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	32,00	8,60	-	26,33	1,53	-
0,05	24,00	5,00	0,8	35,00	4,00	1,3
0,10	31,33	3,79	1,0	42,67	5,51*	1,6
0,20	26,33	3,06	0,8	53,67	2,52**	2,0
0,50	37,00	3,46	1,2	79,67	10,26**	3,0
1,00	57,33	2,31*	1,8	100,67	11,02**	3,8
2,00	78,67	10,12**	2,5	140,67	15,53**	5,3
Contr. Posit.	471,00	21,21	14,7	1674,00	387,50	63,6
RESULTADO rev/g equiv.	26.000 (21.000-31.000)***			110.000 (93.000-127.000)		
Doses (mg equiv.)	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	130,20	14,38	-	112,60	5,18	-
0,05	165,00	7,55*	1,3	163,67	32,35	1,5
0,10	158,00	11,27	1,2	152,67	4,51**	1,4
0,20	198,67	2,52**	1,5	214,00	31,76**	1,9
0,50	180,67	16,80*	1,4	247,00	23,64**	2,2
1,00	231,33	43,02*	1,8	269,50	23,33**	2,4
2,00	272,33	4,16**	2,1	257,67	14,64**	2,3
Contr. Posit.	1960,00	49,50	15,1	456,50	14,85	4,1
RESULTADO rev/g equiv.	5.900 (3.900-7.900)			7.400 (3.400-11.000)		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, * p<0,05, ** p<0,01, *** intervalo de confiança 90%

Tabela 23 – Resultados dos testes de Ames do extrato da água intersticial do sedimento coletado no Ponto C (3a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

Ponto C - 3a. Camp.	ÁGUA INTERSTICIAL					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	28,80	3,90	-	26,60	5,32	-
5	35,67	9,87	1,2	46,00	4,58	1,7
10	38,67	4,51	1,3	57,33	8,02	2,2
50	38,00	10,15	1,3	58,33	4,73**	2,2
100	35,33	6,11	1,2	94,33	2,52**	3,5
500	43,00	7,94	1,5	157,33	9,07**	5,9
Contr. Posit.	224,00	28,28	7,8	154,00	7,07	5,8
RESULTADO <small>rev/g equiv.</small>	ND			660 (570-760)***		
Ponto C - 3a. Camp.	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	145,50	15,93	-	141,40	17,11	-
5	179,33	11,50	1,2	243,00	15,10**	1,7
10	183,67	16,65	1,3	249,33	39,31*	1,8
50	202,67	4,16**	1,4	255,67	23,25**	1,8
100	237,50	38,89*	1,6	318,67	85,98*	2,3
500	244,50	30,41*	1,7	494,33	62,74**	3,5
Contr. Posit.	1757,00	65,05	12,1	436,50	10,61	3,1
RESULTADO <small>rev/g equiv.</small>	830 (560-1.100)			12.000 (8.000-16.000)		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01, *** intervalo de confiança 90%

A amostra coletada no Ponto C, na terceira campanha de amostragem, apresentou atividade mutagênica um pouco mais baixa que na campanha anterior, variando de 10^3 a 10^5 revertentes por grama de sedimento equivalente. Novamente pudemos observar a atividade genotóxica fortemente associada ao material particulado e ainda apresentando alguma atividade na água intersticial. Para a amostra extraída *in natura*, não foi detectada mutagenicidade com a linhagem TA100-S9 e na água intersticial isto foi verificado para a TA98-S9.

Tabela 24 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Rio Piaçaguera (3a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído *in natura*

R. Piaçaguera - 3a. Camp.	SEDIMENTO IN NATURA					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	26,20	4,44	-	26,00	5,92	-
5	29,00	2,65	1,1	41,00	2,00*	1,6
10	33,33	5,69	1,3	36,33	2,89	1,4
50	38,67	3,51*	1,5	45,00	2,00*	1,7
100	44,00	12,53	1,7	45,67	14,36	1,8
Contr. Posit.	504,00	2,83	19,2	527,00	99,70	20,3
RESULTADO rev/g equiv.	180 (100-250)***			170 (80-250)		
R. Piaçaguera - 3a. Camp.	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	143,00	16,66	-	134,20	12,99	-
10	142,33	14,22	1,0	164,67	3,79*	1,2
50	138,33	10,69	1,0	156,67	17,21	1,2
100	147,00	16,09	1,0	152,00	13,23	1,1
500	142,33	10,07	1,0	137,33	10,41	1,0
Contr. Posit.	1735,50	269,41	12,1	246,50	65,76	1,8
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01, *** intervalo de confiança 90%

Tabela 25 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Rio Piaçaguera (3a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído seco

R. Piaçaguera - 3a. Camp.	SEDIMENTO SECO					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	26,20	4,44	-	26,00	5,92	-
1	-	-	-	35,67	2,52	1,4
2	-	-	-	35,33	7,37	1,4
5	48,00	5,00**	1,8	34,50	0,71	1,3
10	42,00	6,00*	1,6	44,00	5,66*	1,7
50	65,00	23,39	2,5	56,67	8,62*	2,2
100	62,33	6,51**	2,4	64,00	18,68	2,5
Contr. Posit.	491,50	98,29	18,8	527,20	99,70	20,3
RESULTADO rev/g equiv.	770 (510-1.000)***			400 (280-520)		
R. Piaçaguera - 3a. Camp.	SEDIMENTO SECO					
	TA100					
	-S9			+S9		
Doses (mg. equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	119,80	10,33	-	122,80	13,81	-
1	137,33	4,16	1,1	136,00	12,77	1,1
2	154,67	5,03*	1,3	148,67	6,66	1,2
5	89,67	15,53	0,7	130,00	5,57	1,1
10	100,00	7,81	0,8	151,33	25,74	1,2
50	96,67	11,59	0,8	109,33	19,55	0,9
100	110,33	14,74	0,9	108,67	2,52	0,9
Contr. Posit.	2453,00	77,78	20,5	558,50	13,43	4,5
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01, *** intervalo de confiança 90%

Tabela 26 – Resultados dos testes de Ames do extrato do pellet resultante da centrifugação do sedimento coletado no Rio Piaçaguera (3a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

R. Piaçaguera - 3a. Camp.	PELLET					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	32,00	8,60	-	26,33	1,53	-
1	34,33	5,00	1,1	33,00	3,46	1,3
5	37,33	3,79	1,2	39,67	9,07	1,5
10	28,00	3,06	0,9	42,33	4,73*	1,6
20	25,67	3,46	0,8	39,00	4,58*	1,5
50	19,67	3,06	0,6	37,33	9,07	1,4
100	30,00	10,12**	0,9	35,00	5,00	1,3
Contr. Posit.	471,00	21,21	14,7	1674,00	387,50	63,6
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		
R. Piaçaguera - 3a. Camp.	PELLET					
	TA100					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	130,20	14,38	-	112,60	5,18	-
1	151,33	8,62	1,2	118,33	37,10	1,1
5	160,33	15,31	1,2	137,00	4,36**	1,2
10	159,00	6,56	1,2	142,00	17,06	1,3
20	130,67	20,74	1,0	166,33	8,50**	1,5
50	112,67	12,90	0,9	127,67	3,51*	1,1
100	94,00	18,19	0,7	117,67	16,50	1,0
Contr. Posit.	1960,00	49,50	15,1	456,50	14,85	4,1
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01

Tabela 27 – Resultados dos testes de Ames do extrato da água intersticial do sedimento coletado no Rio Piaçaguera (3a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9

R. Piaçaguera - 3a. Camp.	ÁGUA INTERSTICIAL					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	28,80	3,90	-	26,60	5,32	-
5	23,67	3,21	0,8	33,67	1,53	1,3
10	25,00	6,93	0,9	29,67	3,06	1,1
50	29,00	9,64	1,0	33,33	5,03	1,3
100	28,33	5,13	1,0	33,00	7,00	1,2
500	29,33	6,51	1,0	25,33	3,79	1,0
Contr. Posit.	224,00	28,28	7,8	154,00	7,07	5,8
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		
R. Piaçaguera - 3a. Camp.	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	145,50	15,93	-	141,40	17,11	-
5	177,33	15,50	1,2	169,00	30,51	1,2
10	169,50	10,61	1,2	133,67	4,04	0,9
50	169,67	7,37	1,2	161,67	21,08	1,1
100	147,00	7,07	1,0	176,33	21,08	1,2
500	153,67	28,59	1,1	157,00	25,46	1,1
Contr. Posit.	1757,00	65,05	12,1	436,50	10,61	3,1
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01

Os resultados obtidos para a amostra coletada no Rio Piaçaguera mostram a presença de compostos genotóxicos observados apenas com a linhagem TA98, que detecta mutágenos que provocam o deslocamento do quadro de leitura do DNA, preferencialmente. Esta atividade, da ordem de 10^2 rev/g equiv. de sedimento, não pode ser verificada quando a amostra foi centrifugada, nem no pellet e tampouco na água intersticial, somente na amostra extraída *in natura* e seca.

Tabela 28 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Rio Queiroz (3a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído *in natura*

R. Queiroz - 3a. Camp.	SEDIMENTO IN NATURA					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	26,20	2,39	-	24,75	5,32	-
50	23,33	6,11	0,9	29,67	4,51	1,2
100	21,00	1,00	0,8	26,67	6,66	1,1
500	30,67	11,15	1,2	37,67	15,70	1,5
750	31,67	6,11	1,2	36,67	9,71	1,5
1000	30,67	6,66	1,2	39,67	2,08*	1,6
Contr. Posit.	473,00	2,83	18,1	527,50	99,70	21,3
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		
R. Queiroz - 3a. Camp.	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	127,60	17,10	-	125,20	13,50	-
5	142,00	9,54	1,1	135,33	8,50	1,1
10	131,50	10,61	1,0	147,33	15,53	1,2
50	120,00	10,58	0,9	127,33	14,01	1,0
100	136,33	5,86	1,1	145,00	19,31	1,2
500	131,00	5,29	1,0	141,67	9,29	1,1
Contr. Posit.	2181,50	14,85	17,1	2076,00	183,85	16,6
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01

O Rio Queiroz foi escolhido como referência e não foi observada atividade mutagênica da amostra coletada e extraída *in natura* com nenhuma das linhagens de *S.typhimurium* empregadas, na ausência e na presença de ativação metabólica.

Tabela 29 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Ponto C (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído *in natura*

Ponto C - 4a. Camp.	SEDIMENTO IN NATURA					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	27,80	5,36	-	28,20	2,77	-
0,05	39,33	1,53*	1,4	43,33	4,04*	1,5
0,10	42,33	11,06	1,5	48,67	5,51*	1,7
0,20	37,00	8,54	1,3	49,00	8,54*	1,7
0,50	38,67	4,62	1,4	67,67	9,81*	2,4
1,00	46,67	10,21	1,7	69,67	14,29*	2,5
2,00	79,00	4,36**	2,8	97,00	6,08**	3,4
5,00	96,67	2,52**	3,5	88,33	4,93**	3,1
Contr. Posit.	360,00	12,73	12,9	507,50	180,31	18,0
RESULTADO rev/g equiv.	21.000 (16.000-25.000)***			80.000 (64.000-99.000)		
Ponto C - 4a. Camp.	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	119,80	10,33	-	122,80	13,81	-
0,05	133,33	7,77	1,1	133,00	8,72	1,1
0,10	143,67	3,21*	1,2	169,33	6,03*	1,4
0,20	167,33	21,57*	1,4	178,00	4,58**	1,4
0,50	185,00	14,18**	1,5	222,00	15,13**	1,8
1,00	257,00	38,18**	2,1	295,67	22,23**	2,4
2,00	254,67	25,74**	2,1	466,00	21,17**	3,8
5,00	374,67	51,39**	3,1	444,33	35,47**	3,6
Contr. Posit.	2453,00	77,78	20,5	558,50	13,43	4,5
RESULTADO rev/g equiv.	130.000 (107.000-160.000)			170.000 (160.000-180.000)		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, * p<0,05, ** p<0,01, *** Intervalo de confiança 90%

Tabela 30 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Ponto C (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído seco

Ponto C - 4a. Camp.	SEDIMENTO SECO					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	27,80	5,36	-	28,20	2,77	-
0,05	28,00	10,58	1,0	35,00	2,65	1,2
0,10	31,67	3,79	1,1	38,33	5,86	1,4
0,20	29,33	2,08	1,1	44,67	9,02	1,6
0,50	32,00	7,00	1,2	47,50	0,71**	1,7
1,00	44,33	3,21*	1,6	84,67	15,95**	3,0
2,00	41,67	2,08*	1,5	85,67	7,37**	3,0
Contr. Posit.	360,00	12,73	12,9	507,50	180,31	18,0
RESULTADO rev/g equiv.	8.100 (4.300-12.000)***			51.000 (42.000-60.000)		
Ponto C - 4a. Camp.	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	101,40	5,41	-	106,40	7,83	-
0,05	118,00	8,19	1,2	124,33	6,66	1,2
0,10	118,33	11,72	1,2	151,67	6,66**	1,4
0,20	109,00	19,08	1,1	171,33	0,58**	1,6
0,50	135,33	2,52**	1,3	277,33	3,51**	2,6
1,00	120,00	8,19	1,2	239,00	15,72**	2,2
2,00	130,67	1,53**	1,3	250,00	5,29**	2,3
Contr. Posit.	2356,00	8,48	23,2	508,50	36,06	4,8
RESULTADO rev/g equiv.	56.000 (32.000-81.000)			340.000 (320.000-360.000)		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, * p<0,05, ** p<0,01, *** intervalo de confiança 90%

Tabela 31 – Resultados dos testes de Ames do extrato do pellet resultante da centrifugação do sedimento coletado no Ponto C (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* na presença e na ausência de S9

Ponto C - 4a. Camp.	PELLET					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	32,00	8,60	-	26,33	1,53	-
0,05	33,33	2,89	1,0	40,33	7,57	1,5
0,10	37,00	4,58	1,2	69,67	4,93**	2,6
0,20	33,67	5,51	1,1	70,00	2,00**	2,7
0,50	66,00	6,93*	2,1	109,00	11,53**	4,1
1,00	86,67	10,21**	2,7	111,00	20,66**	4,2
2,00	137,00	14,00**	4,3	136,00	21,07**	5,2
Contr. Posit.	471,00	21,21	14,7	1674,00	387,50	63,6
RESULTADO rev/g equiv.	55.000 (47.000-62.000)***			53.000 (44.000-63.000)		
Doses (mg equiv.)	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	130,20	14,38	-	112,60	5,18	-
0,05	175,67	14,19*	1,3	208,67	15,01**	1,9
0,10	172,33	11,59*	1,3	213,33	19,55**	1,9
0,20	171,67	23,18	1,3	254,67	36,47**	2,3
0,50	184,33	12,34*	1,4	293,33	2,89**	2,6
1,00	208,67	14,57**	1,6	249,00	27,22**	2,2
2,00	223,33	5,86**	1,7	262,00	6,24**	2,3
Contr. Posit.	1960,00	49,50	15,1	456,50	14,85	4,1
RESULTADO rev/g equiv.	80.000 (60.000-100.000)			770.000 (650.000-880.000)		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, * p<0,05, ** p<0,01, *** intervalo de confiança 90%

Tabela 32 – Resultados dos testes de Ames do extrato da água intersticial do sedimento coletado no Ponto C (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* na presença e na ausência de S9

Ponto C – 4a. Camp.	ÁGUA INTERSTICIAL					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	28,80	3,90	-	26,60	5,32	-
5	26,67	5,03	0,9	43,00	4,36*	1,6
10	31,00	6,08	1,1	51,33	4,62**	1,9
50	31,67	2,08	1,1	62,67	9,61**	2,4
100	32,67	7,77	1,1	74,67	3,06**	2,8
500	48,33	3,79**	1,7	130,67	16,50**	4,9
Contr. Posit.	224,00	28,28	7,8	154,00	7,07	5,8
RESULTADO rev/g equiv.	40 (25-54)***			2.600 (1.900-3.400)		
Ponto C – 4a. Camp.	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	145,50	15,93	-	141,40	17,11	-
5	188,33	4,04*	1,3	177,00	9,90	1,3
10	181,33	12,74	1,2	220,67	8,08**	1,6
50	177,77	6,35	1,2	228,67	9,81**	1,6
100	180,50	4,95	1,2	265,67	41,36*	1,9
500	179,00	9,90	1,2	549,33	57,47**	3,9
Contr. Posit.	1757,00	65,05	12,1	436,50	10,61	3,1
RESULTADO rev/g equiv.	ND			7.800 (5.200-10.000)		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01, *** intervalo de confiança 90%

Verificou-se, na última campanha de coleta do Ponto C, a presença de atividade genotóxica, detectada principalmente associada ao material particulado, independentemente dos procedimentos de preparo das amostras. As potências variaram entre 10^3 e 10^5 revertentes por grama equivalente de sedimento para a porção sólida da amostra (Tabelas 29 a 31). Para a água intersticial verificou-se atividade muito baixa detectada com a TA98-S9 e da ordem de 10^3 rev/g equiv. quando empregada as linhagens TA98 e TA100 na presença de ativação metabólica.

Tabela 33 – Resultados dos testes de Ames) para o sedimento coletado no Rio Piaçaguera (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído *in natura*

R. Piaçaguera - 4a. Camp.	SEDIMENTO IN NATURA					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	22,60	4,93	-	26,80	5,54	-
10	34,00	9,64	1,5	38,33	6,66	1,4
20	42,33	1,53**	1,9	46,00	9,17	1,7
50	33,33	3,06	1,5	50,33	3,06**	1,9
100	34,67	7,09	1,5	40,33	5,86	1,5
Contr. Posit.	489,00	9,9	21,6	1792,50	61,52	66,9
RESULTADO rev/g equiv.	1.000 (600-1.400)***			510 (340-690)		
	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Doses (mg equiv.)						
Contr. Negat.	130,80	10,71	-	136,60	26,18	-
10	110,67	3,06	0,8	144,00	9,64	1,1
20	107,67	10,02	0,8	157,33	14,15	1,2
50	118,33	14,47	0,9	141,67	15,28	1,0
100	133,67	6,66	1,0	188,00	1,41	1,4
500	124,67	16,67	1,0	156,00	14,73	1,1
Contr. Posit.	607,50	28,33	4,6	880,00	7,07	6,4
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01, *** intervalo de confiança 90%

Tabela 34 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Rio Piaçaguera (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído seco

R. Piaçaguera - 4a. Camp.	SEDIMENTO SECO					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	22,60	4,93	-	26,80	5,54	-
5	38,00	5,29*	1,7	32,00	4,00	1,2
10	38,00	4,00*	1,7	45,67	9,29	1,7
20	46,67	5,13**	2,1	52,33	6,51*	2,0
50	37,67	8,33	1,7	54,00	6,00**	2,0
100	-	-	-	36,67	2,08	1,4
Contr. Posit.	489,00	9,90	21,6	1792,50	99,70	66,9
RESULTADO rev/g equiv.	1.300 (890-1.700)***			550 (360-750)		
R. Piaçaguera - 4a. Camp.	SEDIMENTO SECO					
	TA100					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	101,40	5,41	-	106,40	7,83	-
5	124,67	5,86*	1,2	142,33	4,04**	1,3
10	98,00	6,00	1,0	139,50	10,61*	1,3
50	84,33	5,03	0,8	113,67	6,81	1,1
100	100,33	26,86	1,0	141,67	22,85	1,3
500	158,00	20,88*	1,6	154,67	51,39	1,5
Contr. Posit.	2356,00	8,49	23,2	508,50	36,06	4,8
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01, *** intervalo de confiança 90%

Tabela 35 – Resultados dos testes de Ames do extrato do pellet resultante da centrifugação do sedimento coletado no Rio Piaçaguera (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* na presença e na ausência de S9

R. Piaçaguera - 4a. Camp.	PELLET					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	32,00	8,60	-	26,33	1,53	-
1	33,33	0,58	1,0	33,33	3,21	1,3
5	29,00	5,00	0,9	30,67	5,03	1,2
10	44,33	7,64	1,4	37,00	5,20	1,4
20	-	-	-	37,33	2,52*	1,4
50	26,67	2,31	0,8	37,33	3,51*	1,4
100	28,67	5,03	0,9	32,00	5,29	1,2
Contr. Posit.	471,00	21,21	14,7	1674,00	387,50	63,6
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		
R. Piaçaguera - 4a. Camp.	PELLET					
	TA100					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	130,20	14,38	-	112,60	5,18	-
1	149,00	9,54	1,1	140,67	8,39*	1,2
5	146,33	7,57	1,1	141,33	11,55*	1,3
10	122,67	6,11	0,9	139,33	18,56	1,2
20	129,00	12,49	1,0	158,33	13,20**	1,4
50	124,67	27,65	1,0	122,33	9,61	1,1
100	101,67	22,30	0,8	130,67	4,04	1,2
Contr. Posit.	1960,00	49,50	15,1	456,50	14,85	4,1
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01, *** intervalo de confiança 90%

Tabela 36— Resultados dos testes de Ames do extrato da água intersticial do sedimento coletado no Rio Piaçaguera (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* na presença e na ausência de S9

R. Piaçaguera - 4a. Camp.	ÁGUA INTERSTICIAL					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	28,80	3,90	-	26,60	5,32	-
5	26,67	10,02	0,9	33,67	5,77	1,3
10	24,50	4,95	0,9	39,00	6,56	1,5
50	28,33	2,31	1,0	35,33	2,08	1,3
100	32,67	1,53	1,1	32,67	4,04	1,2
500	25,00	1,00	0,9	35,00	6,56	1,3
Contr. Posit.	224,00	28,28	7,8	154,00	7,07	5,8
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		
R. Piaçaguera - 4a. Camp.	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	145,50	15,93	-	141,40	17,11	-
5	175,67	15,50	1,2	155,67	8,50	1,1
10	172,67	21,83	1,2	155,67	12,06	1,1
50	198,33	24,91	1,4	167,67	6,43	1,2
100	164,67	24,50	1,1	165,67	9,29	1,2
500	172,00	22,63	1,2	170,67	6,66	1,2
Contr. Posit.	1757,00	65,05	12,1	436,50	10,61	3,1
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01

Assim como na campanha anterior, o sedimento do Rio Piaçaguera apresentou atividade genotóxica com a linhagem TA98 de *S.typhimurium*, na presença e na ausência de ativação metabólica, para a amostra extraída *in natura* ou seca. Observamos também que não foi detectada genotoxicidade para o pellet resultante da centrifugação da amostra e para a água intersticial.

Tabela 37 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Rio Queiroz (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído *in natura*

R. Queiroz - 4a. Camp.	SEDIMENTO IN NATURA						
	TA98						
	Doses (mg equiv.)	-S9			+S9		
Média		DP	RM	Média	DP	RM	
Contr. Negat.	26,20	2,39	-	24,75	5,32	-	
10	25,67	2,08	1,0	23,00	2,00	0,9	
50	21,00	2,00	0,8	27,33	1,04	1,1	
100	23,00	2,00	0,9	28,33	3,06	1,1	
500	23,00	2,65	0,9	33,67	5,69	1,4	
Contr. Posit.	248,50	65,76	9,5	574,50	19,09	23,2	
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND			
	TA100						
	Doses (mg equiv.)	-S9			+S9		
		Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	101,40	5,41	-	106,40	7,83	-	
10	128,33	7,51*	1,3	118,33	4,93	1,1	
50	106,33	6,11	1,0	118,33	12,66	1,1	
100	102,00	37,24	1,0	11,67	3,79	0,1	
500	87,00	10,44	0,9	88,33	4,16	0,8	
Contr. Posit.	2356,00	8,48	23,2	508,50	36,06	4,8	
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND			

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01

Tabela 38 – Resultados dos testes de Ames para o sedimento coletado no Rio Queiroz (4a. campanha), frente às linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença e na ausência de S9, extraído seco

R. Queiroz - 4a. Camp.	SEDIMENTO SECO					
	TA98					
	-S9			+S9		
Doses (mg equiv.)	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	27,80	5,36	-	28,20	2,77	-
10	32,33	3,51	1,2	26,67	3,06	0,9
50	27,67	1,53	1,0	20,33	2,08	0,7
100	26,50	4,95	1,0	29,67	3,79	1,1
500	21,67	3,06	0,8	28,33	6,51	1,0
Contr. Posit.	360,00	12,73	12,9	507,50	180,31	18,0
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		
R. Queiroz - 4a. Camp.	TA100					
	-S9			+S9		
	Média	DP	RM	Média	DP	RM
Contr. Negat.	101,40	5,41	-	106,40	7,83	-
10	132,00	8,72*	1,3	114,00	16,09	1,1
50	114,33	8,50	1,1	120,00	10,15	1,1
100	138,67	15,37*	1,4	139,67	13,65*	1,3
500	140,33	4,93**	1,4	151,67	9,87**	1,4
Contr. Posit.	2356,00	8,48	23,2	508,50	36,06	4,8
RESULTADO rev/g equiv.	ND			ND		

DP – desvio padrão, RM – razão de mutagenicidade, ND – atividade mutagênica não detectável nas condições do ensaio, * p<0,05, ** p<0,01

A amostra coletada no local de referência, o Rio Queiroz, extraída *in natura* e seca, não apresentou atividade genotóxica, em nenhuma das condições/linhagens testadas.

Os estudos de avaliação da qualidade de sedimentos mostram que a extração orgânica pode ser realizada na amostra *in natura* ou seca. Alguns autores secam as amostras em temperaturas que variam desde ambiente até 50°C (Suzuki *et al*, 1982; West *et al*, 1986, 1988; Fabacher *et al*, 1988; Maccubbin *et al*, 1991; Abe & Urano, 1994) e outros o fazem em dessecador (Marvin *et al*, 1993, 1999; Durant *et al*, 1994). Há ainda a opção de liofilizar o sedimento (Samoloff *et al*, 1983; Oishi & Takahashi, 1987; Wolska *et al*, 2003) e o congelamento da amostra (Grifoll *et al*, 1990; Fernández *et al*, 1992; Dutka *et al*, 1995; Gagne *et al*, 1999; Picer *et al*, 2001; Bombardier *et al*, 2001; Viganò *et al*, 2002). A centrifugação do sedimento foi relatada (Sato *et al*, 1983; Thomas *et al*, 2002). Os sedimentos foram extraídos *in natura* para avaliação da atividade genotóxica por diversos autores (Maccubbin & Ersing, 1991; Durant *et al*, 1992; Ho & Quinn, 1993; Balch *et al*, 1995; Jarvis *et al*, 1996; Papoulias & Buckler, 1996; White *et al*, 1998a; Randerath *et al*, 1999; Kammann *et al*, 2000, 2001).

Em nosso estudo, quando se observa os resultados obtidos extraíndo-se a amostra *in natura* e seca, pode-se notar que em alguns casos a primeira metodologia parece ser mais eficiente que outra, porém isto não é válido para todas as amostras analisadas. Uma comparação entre os dados obtidos com os dois métodos está apresentada na Figura 11. Verifica-se que não há diferenças significativas entre elas, porém, de uma maneira geral, as amostras extraídas *in natura* apresentam potências maiores no Ponto C. Para o Rio Piaçaguera, observamos o inverso, sendo que em alguns casos a atividade genotóxica foi detectada após extração do sedimento seco e não foi observada quando a amostra era extraída *in natura*.

Foi observado também uma grande variação na quantidade de água presente nestas amostras, tanto no que se refere aos próprios sedimentos, como nas diferentes amostragens, que pode interferir no cálculo da potência real das amostras e, conseqüentemente, na comparação entre as duas técnicas de extração orgânica.

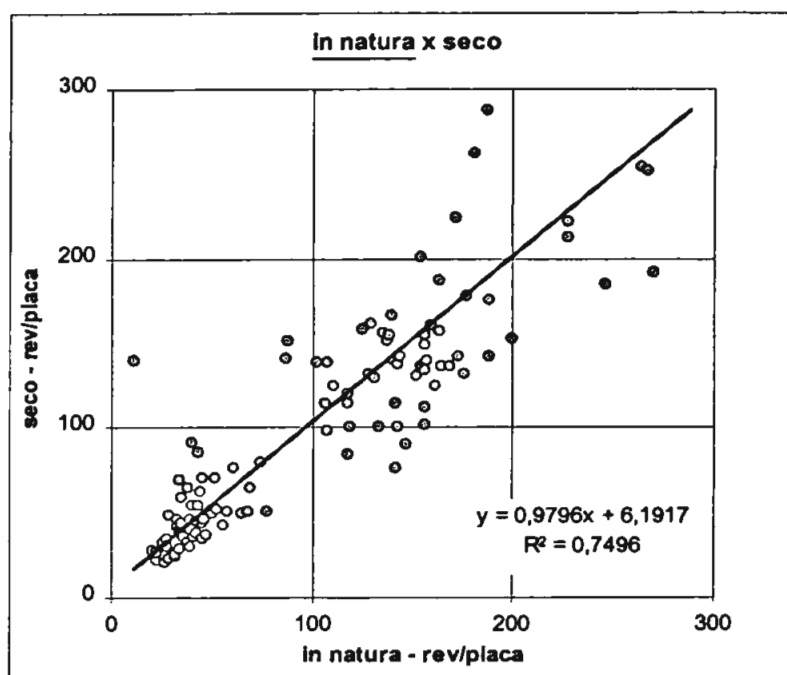


Figura 11 – Reta de regressão comparando as metodologias de extração orgânica dos sedimentos: *in natura* e *seco*

A Tabela 39 apresenta um resumo de todos os resultados de genotoxicidade obtidos nas campanhas 2, 3 e 4 expressos em revertentes/g equivalentes de sedimento.

Pode-se observar também a presença de atividade mutagênica detectada na água intersticial. Embora com potências mais baixas em relação àquelas apresentadas em associação ao material particulado, são dados que chamam a atenção. Thomas *et al* (2002) analisaram a água intersticial de 28 amostras de sedimento e não encontraram atividade genotóxica em nenhuma delas detectável com o ensaio Mutatox e verificaram mutagenicidade presente no material particulado de 7 destes sedimentos. Os autores sugeriram a ausência de compostos genotóxicos hidrofílicos e conseqüente indisponibilidade de contaminantes para os organismos bentônicos.

O Ponto C é um local extremamente contaminado e está sob influência direta dos despejos da Cia. Siderúrgica Paulista, onde poderia haver, portanto, quantidades consideráveis de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Os HPAs resultam da combustão incompleta de matéria orgânica, podendo ser formados naturalmente, como em incêndios em florestas, ou ter origem antropogênica, como na queima de combustíveis fósseis, em incineração de resíduos e produção de carvão coque,

outros processos industriais (McCready *et al*, 2000). Em geral, existe uma boa correlação entre as concentrações de HPAs encontradas em ambientes aquáticos e o grau de urbanização e industrialização das áreas em torno destes corpos d'água. Estes compostos são hidrofóbicos, com pouca solubilidade em água e não se esperaria detectá-los na coluna d'água, tampouco na água intersticial (Cerniglia, 1992). Em nosso estudo, a mutagenicidade encontrada nesta matriz parece, no entanto, poder ser devida a esta classe de compostos, pelo menos em parte.

Randow *et al* (1996) demonstram haver quantidades pequenas de HPAs na coluna d'água (cerca de 20ng/L), em uma região da antiga Alemanha Oriental, onde os sedimentos estão extensamente contaminados com estes compostos. Um estudo recente demonstra a existência de HPAs em águas marinhas na costa de Alexandria, no Egito, em quantidades pequenas, com a maior média 245ng/L em uma região de descarga de efluentes (Nemr & Abd-Allah, 2003).

Tabela 39 – Potência das amostras de sedimento, em número de revertentes por grama equivalente de sedimento, coletadas no Ponto C e no Rio Piaçaguera, nas diferentes campanhas de amostragem, preparadas para extração de maneiras diversas

Local de coleta	Preparo da Amostra	linhagem de <i>Salmonella typhimurium</i>	Revertentes/g de sedimento equiv.		
			2a. Campanha	3a. Campanha	4a. Campanha
Ponto C	<i>in natura</i>	TA98	210.000	8.700	21.000
		TA98+S9	230.000	28.000	80.000
		TA100	59.000	ND	130.000
		TA100+S9	140.000	22.000	170.000
	<i>seco</i>	TA98	14.000	17.000	8.100
		TA98+S9	74.000	51.000	51.000
		TA100	150.000	290.000	56.000
		TA100+S9	160.000	320.000	340.000
	<i>pellet</i>	TA98	13.000	26.000	55.000
		TA98+S9	61.000	110.000	53.000
		TA100	140.000	5.900	80.000
		TA100+S9	290.000	7.400	770.000
	água intersticial	TA98	760	ND	40
		TA98+S9	1.600	660	2.600
		TA100	1.200	830	ND
		TA100+S9	580	12.000	7.800
Rio Piaçaguera	<i>in natura</i>	TA98	ND	180	1000
		TA98+S9	ND	170	510
		TA100	ND	ND	ND
		TA100+S9	ND	ND	ND
	<i>seco</i>	TA98	1.600	770	1.300
		TA98+S9	1.500	400	550
		TA100	ND	ND	ND
		TA100+S9	640	ND	ND
	<i>pellet</i>	TA98	4.700	ND	ND
		TA98+S9	6.400	ND	ND
		TA100	ND	ND	ND
		TA100+S9	2.700	ND	ND
	água intersticial	TA98	ND	ND	ND
		TA98+S9	ND	ND	ND
		TA100	ND	ND	ND
		TA100+S9	ND	ND	ND

ND – mutagenicidade não detectável nas condições do ensaio

Se compararmos todos os resultados obtidos neste estudo, verificamos que, independentemente do método de extração ou da linhagem de *Salmonella typhimurium* utilizados, as maiores potências foram obtidas na presença de metabolização. Isto sugere uma prevalência de mutágenos indiretos nos locais analisados, o que está de acordo com a grande concentração de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos na região. (CETESB, 1998)

Analisando-se os resultados nas 4 campanhas, observa-se que o sedimento Ponto C encontra-se mais contaminado que o do Rio Piaçaguera, mesmo havendo diferenças entre as amostragens e procedimentos de extração orgânica. O tipo de resposta observado com as duas linhagens de *S.typhimurium*, TA98 e TA100, em adição às potências mais elevadas na presença do sistema de ativação metabólica, indicam a presença de contaminantes do tipo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no Ponto C, o que é corroborado por análises químicas (Barreto, 1995; CETESB, 1998) e pelo tipo de indústria presente no local.

A contaminação existente no Rio Piaçaguera, no entanto, parece dever-se a outros tipos de poluentes, que estão em menor quantidade ou possuem menor potência, já que as respostas foram mais baixas. Os dados sugerem, ainda, a presença de mutágenos diretos e indiretos neste local, prevalecendo as mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura do DNA, detectados preferencialmente pela TA98.

Chama a atenção a atividade genotóxica detectada na ausência de ativação metabólica, que, em alguns casos, é muito semelhante àquela verificada na presença de metabolização. Pode-se inferir a presença, nestas amostras, de HPAs substituídos, como os nitro-HPAs ou oxi-HPAs, que teriam atividade mutagênica direta, como foi sugerido por Metcalfe *et al* (1990) que encontrou também respostas positivas nos sedimentos do Porto de Hamilton, com as linhagens TA98 e TA100, na ausência de metabolização e Broman *et al* (1994) que verificou atividade genotóxica nos sedimentos coletados no arquipélago de Estocolmo com a linhagem TA100, na ausência de S9.

Podemos sugerir ainda que parte desta genotoxicidade detectada na ausência de metabolização *in vitro* seja devida à atividade dos produtos de transformação dos próprios HPAs por organismos autóctones. Um estudo feito na mesma região, com

as mesmas amostras demonstrou a ocorrência, tanto nos sedimentos do Ponto C, como nos do Rio Piaçaguera, de algumas espécies de fungos capazes de metabolizar HPAs isoladamente ou na mistura complexa, com grande eficácia (Silva, 2002). A detecção de atividade genotóxica resultante da ação de metabólitos provenientes da ação de microrganismos do sedimento também é sugerida por Randerath *et al*, 1999.

5.2. ETAPA II – GENOTOXICIDADE DE SEDIMENTOS DA BAIXADA SANTISTA

Os resultados da avaliação da genotoxicidade das amostras de sedimento coletadas em vários locais da Baixada Santista estão apresentados na Tabela 40.

Tabela 40 – Resultados de teste de Ames dos extratos de sedimento coletados nos diferentes locais da Baixada Santista, frente às linhagens TA98 e TA100, na presença e na ausência de S9

Local	linhagem	S9	doses (mg equiv.)						result (rev/g)	
			0	10	50	100	250	500		
pto 1	TA98	-	24	23	31	29		29	ND	
		+	27	35	46	41		38		
pto 2	TA98	-	36	23	27	30	33	43	ND	
		+	32	32	31	38	29	37		
	TA100	-	149	141	124	147	150	154		
		+	149	152	152	185	169	161		
pto 3	TA98	-	36	39	42	50	44	40	70	
		+	32	40	32	53	50	47		
	TA100	-	149	180	171	189	160	153		
		+	149	170	183	187	166	138		
pto 4	TA98	-	33	37	33	34	39		ND	
		+	42	44	45	43	40			
	TA100	-	123	129	115	106	90			
		+	127	155	169	113	107			
pto 5b	TA98	-	29	35		47		53	170	
		+	30	40	38	63		50	270	
	TA100	-	114		129	174		190	540	
		+	121	156	159	178		190	680	
pto 10	TA98	-	28	24	27	28	25	25	ND	
		+	27	28	33	32	22	24		
	TA100	-	140	154	141	132	122	115		
		+	146	165	193	175	121	113		
pto 12	TA98	-	33	46	33	29	46		ND	
		+	42	43	43	37	20			
	TA100	-	123	140	137	129	142			
		+	127	137	149	140	144			
pto 14	TA98	-	36	40	24	23	25	22	ND	
		+	33	36	28	39	35	37		
	TA100	-	149	157	131	142	139	123		
		+	149	163	131	136	147	150		
pto 18	TA98	-	28	33	32	32			ND	
		+	33	37	36	44		30		
	TA100	-	114	172	174	179		146		
		+	121	149	151	204		173		
pto 5a	TA98	-	28	32	32	44	44	45	1.800	
		+	33	62	59	84	82	96	29.000	
	TA100	-	136	151	183	202	t	t	37.000	
		+	123	178	234	359	t	t	110.000	
	pto 5c	TA98	-	34	42	53	49	56	53	4.400
			+	40	75	102	97	120	91	63.000
		TA100	-	177	216	205	226	219	208	21.000
			+	167	450	412	482	444	469	610.000

ND – atividade genotóxica não detectável nas condições do ensaio

Podemos observar que dos nove locais amostrados, verificou-se atividade genotóxica apenas no Rio Cubatão, próximo à ponte de ferro (ponto 3) e na bacia de evolução da COSIPA (pontos 5a, b, c). Um resumo das principais fontes e dos contaminantes encontrados nos sedimentos dos locais estudados encontra-se na Tabela 41.

Tabela 41 – Principais fontes de poluição e contaminantes encontrados nos sedimentos da Baixada Santista estudados (adaptado de CETESB, 2001), resultados qualitativos da atividade genotóxica destas amostras (este estudo) e de toxicidade crônica com o ouriço marinho *Lytechinus variegatus* (adaptado de Prósperi, 2002).

local	principais fontes de poluição	contaminantes químicos	genotox.	toxic. crônica
pto 1 – Rio Cubatão, barragem	lixão dos Pilões água contaminada Sistema Alto Tietê (RMSP)	Cd, Cr, Ni , HPAs	ND	T
pto 2 – Rio Perequê	depósito da Rhodia	As, Cd, Cu, Ni hexaclorobenzeno, BHC	ND	T
pto 3 – Rio Cubatão, ponte de ferro	indústrias químicas e petroquímicas, ETE Cubatão	Cd, Cr, Ni , HPAs	+	T
pto 4 – Rio Piaçaguera, jusante do Rio Mogi	indústrias de fertilizantes	As, Cd, Ni, Cu, dioxinas e furanos, HPAs	ND	NT
pto 5 – Bacia de evolução da COSIPA	COSIPA (siderurgia, coqueria)	PCBs, HPAs, metais pesados em geral, compostos fenólicos	+++	NT (5A) T (5B)
pto 10 – Rio Casqueiro	lixão da Alemoa, esgotos	-	ND	T
pto 12 – Rio Santana	CIEL	BHC, Hg, Cd, Cu, Ni	ND	T
pto 14 – Rio Mariana, largo de São Vicente	fontes diversas	BHC, Hg	ND	NT
pto 18 – Baía de Santos, saído do emissário	esgotos, sedimentos dragados	Cu, PCBs	ND	T

ND: atividade genotóxica não detectável nas condições do ensaio, NT: não tóxico, +: atividade genotóxica ou tóxica positiva

O Rio Cubatão é um corpo de água doce, com pequena ou nenhuma influência da cunha salina, que recebe carga poluidora principalmente de indústrias químicas e petroquímicas da região, além da estação de tratamento de esgotos (ETE) de Cubatão, estando enquadrado na Classe 3 descrita na Resolução CONAMA de 1986 (CETESB, 2001). O sedimento coletado neste local apresentou atividade genotóxica

considerada baixa, de 70 revertentes por grama de sedimento equivalente, detectada apenas com a linhagem TA98+S9.

A bacia de evolução da COSIPA tem águas salobras, enquadrada na Classe 7 da Resolução CONAMA de 1986, e sofre influência direta dos descartes da siderúrgica e coqueria (CETESB, 2001). Neste local foram encontrados altos níveis de atividade genotóxica, detectável com todas as condições e linhagens de *Salmonella typhimurium* empregadas, com prevalência de mutágenos indiretos que causam substituição de pares de bases no DNA, detectados com a TA100 na presença de S9, resposta característica de HPAs.

Os outros pontos amostrados não apresentaram atividade genotóxica detectável nas condições em que foram realizados os ensaios. O ponto 1, Rio Cubatão, na barragem, tem como principais fontes de poluição o lixão de Pilões e as águas contaminadas do Sistema Alto Tietê (região metropolitana de São Paulo), via canal de fuga da Usina Hidrelétrica Henry Borden. O Rio Perequê (ponto 2), faz também parte da bacia do Cubatão e sofre influência de solventes halogenados, organoclorados aromáticos e pesticidas organoclorados provenientes de disposição de resíduos da Rhodia. O ponto 4, Rio Piaçaguera a jusante do Rio Mogi, recebe descargas de indústrias de fertilizantes (CETESB, 2001). Pelas características das principais fontes de poluição destes corpos d'água, seria esperado observar atividade mutagênica nos sedimentos dos pontos 2 e 4 (Claxton *et al*, 1998; Kubo *et al*, 2002), porém não foram detectados pelo teste de Ames, podendo indicar que a situação em termos de contaminação com agentes genotóxicos parece estar menos crítica do que poder-se-ia esperar. As amostras de sedimento coletadas no Rio Piaçaguera na Etapa I deste trabalho apresentaram, em sua maioria, respostas positivas para o ensaio de genotoxicidade. Possivelmente, as diferenças encontradas devem-se à localização do ponto de amostragem, com maior ou menor deposição de contaminantes, o que também serve de alerta para a necessidade de se caracterizar a contaminação observada neste local.

Esgotos de origem doméstica, após tratamento em ETE seguido de cloração, podem apresentar atividade mutagênica, e têm sido considerados como a principal fonte de mutágenos em ecossistemas aquáticos nos Estados Unidos e Canadá (White & DeMarini, 2000). Alguns pesquisadores demonstraram a presença de aminas

heterocíclicas originárias de dejetos humanos, que poderiam também ser fonte de contaminação ambiental por esgotos (Kataoka *et al*, 2000). Neste estudo, os locais onde a contaminação da água era proveniente prioritariamente de esgotos, não foi observada atividade genotóxica, como na amostra coletada no Rio Casqueiro (ponto 10). Os sedimentos dos Rios Santana e Mariana se mostraram semelhantes em termos de contaminação, e não apresentaram atividade mutagênica. O ponto 18, que recebe despejos de efluentes domésticos tratados e clorados, provenientes do emissário de Santos, não apresentou atividade genotóxica detectável pelo teste de Ames.

Os sedimentos do canal de evolução da COSIPA apresentaram atividade genotóxica característica da presença de HPAs. Os nossos resultados mostraram que as potências mais altas foram obtidas com a linhagem TA100 de *Salmonella typhimurium*, na presença de S9, da ordem de 10^5 revertentes por grama de sedimento equivalente, apontando a presença de mutágenos indiretos, que levam a mutações do tipo substituição de pares de bases do DNA. Potências também bastante altas foram encontradas com a linhagem TA98+S9, reforçando a característica dos contaminantes da coqueria. A detecção de atividade mutagênica sem a adição de metabolização indica a presença de outros compostos associados aos HPAs, sejam HPAs substituídos (nitro- ou oxi-HPAs) ou metabólitos resultantes da ação metabolizadora de fungos presentes nesta área (Silva, 2002).

Randerath *et al*, 1999, obtiveram respostas positivas com a linhagem TA98, na presença de S9, com potências 610.000 rev/g, 1.660.000 rev/g e 128.000 rev/g em uma área contaminada com o mesmo tipo de compostos.

Valores mais baixos foram encontrados por Broman *et al* (1994), que obtiveram com a linhagem TA100+S9 potências de 340 rev/g, 1.400 rev/g e 1.700 rev/g em sedimentos coletados em diferentes regiões do arquipélago de Estocolmo. Estes autores encontraram resposta positiva para esta linhagem na ausência de ativação metabólica na região estuarina do meio do arquipélago, com potência de 190 rev/g e, no mar Báltico, de 880 rev/g. Estes resultados foram obtidos na fração específica para compostos poliaromáticos e não no extrato total de sedimento.

Fernandéz *et al*, 1992, também obtiveram valores na mesma ordem de grandeza que os que foram observados no nosso estudo, na região do estuário de Besos, na Espanha, com potência de 120.000 rev/g detectada com a linhagem TA98+S9. As amostras coletadas na região costeira apresentaram valores mais altos, 130.000 rev/g, 1.200.000 rev/g, 1.500.000 rev/g e 2.800.000 rev/g com a mesma linhagem e ainda 50.000 rev/g em uma área de disposição de resíduos. Estes resultados se referem também à fração do extrato de sedimento específica para detecção de compostos aromáticos policíclicos.

Para os sedimentos avaliados na região dos Grande Lagos, nos Estados Unidos e no Canadá, as maiores potências encontradas no Rio Buffalo (Nova York) variaram entre 2.900 e 12.000 rev/g; dez estações do Rio Grand Calumet apresentaram uma potência média de 23.500 rev/g e no Rio Detroit variaram de 80 a 2.600 rev/g, sempre com a linhagem TA98, na presença de ativação metabólica (Maccubbin *et al*, 1991).

A comparação entre potências de genotoxicidade deste ou de outro local, no entanto, requer muita cautela, já que as metodologias de extração química destas matrizes são, em geral, muito distintas, podendo privilegiar a extração/concentração/detecção de grupos de compostos diferentes.

Um local com características semelhantes aos Pontos 5 e C estudados neste trabalho, é o Porto de Hamilton, que fica no Lago Ontário, na região dos Grandes Lagos, que recebe efluentes industriais, efluentes municipais, descargas de atividade de navegação e está principalmente sob influência de uma grande indústria siderúrgica e coqueria (Marvin *et al*, 1993). Verificou-se que os extratos orgânicos destes sedimentos eram capazes de induzir carcinomas hepáticos em trutas (Metcalf *et al*, 1990). No porto de Hamilton, os níveis totais de HPAs encontrados foram da ordem de 1.000.000 µg/Kg de sedimento seco e apresentaram atividade mutagênica associada às frações dos extratos de sedimento que continham estes compostos (Marvin *et al*, 1990).

A Tabela 42 apresenta as concentrações de HPAs obtidas nas análises químicas realizadas nas amostras de sedimento coletadas na Baixada Santista.

Tabela 42 – Concentrações de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, expressos em $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de sedimento seco, determinadas nas amostras de sedimento coletadas na Baixada Santista (modificado de Prósperi, 2001)

Ponto de coleta	Naftaleno	Acenafileno	Acenafeno	Fluoreno	Fenantreno	Antraceno	Fluran-teno	Pireno	Benzo-antraceno	Criseno	Benzo-a-pireno	Dibenzo-a-antraceno	Total de HPAs
1	47	81	33	83	480	140	470	480	470	530	530	210	3554
2	20	2,4	5,9	5,5	37	9,9	13	31	48	53	49	35	309,7
3	1,1	0,4	1,3	0,5	5,6	2,2	1,3	1,8	1,5	2,9	3,8	3,3	36,3
4	55	120	100	140	460	270	560	570	620	530	510	170	5.365
5a	2.100	3.600	950	1.500	8.900	5.400	26.000	22.000	18.000	18.000	1.800	950	114.600
5b	860	3.400	1.000	4.500	21.000	11.000	27.000	20.000	13.000	13.000	2.700	1.300	126.710
5c	73.000	68.000	64.000	80.000	88.000	56.000	94.000	70.000	52.000	55.000	24.000	9.700	733.700
10	18	25	8,2	15	95	38	110	150	140	110	210	90	1.479,2
12	2,7	< 1,0	< 1,0	1,4	10	< 1,0	5,8	6,1	10	7,3	3,3	< 1,0	55,6
14	1,6	0,3	0,3	0,7	3,2	0,9	3,4	2,4	< 1,0	< 1,0	1,1	0,3	17,2
18	< 1,0	7,4	3,1	6	11	2,5	6,6	5	3,3	3,8	4,6	2,2	82,6

Negrito - HPAs que são positivos para o teste de Ames

Sombreado –resposta positiva para teste de Ames no nosso estudo

Verifica-se que os valores de HPAs totais variam consideravelmente de local para local, sendo o Rio Mariana o local onde se observou a menor concentração de HPAs ($17,2\mu\text{g}/\text{Kg}$). O ponto 5 se sobressai e pode-se notar a diferença encontrada entre as concentrações destes compostos nas diferentes réplicas. Segundo Metcalfe *et al*, 1990, a distribuição de compostos aromáticos policíclicos em sedimentos não é uniforme, e tanto a concentração como a composição dos HPAs pode variar dentro de uma área relativamente pequena.

Um estudo realizado ao longo de toda a extensão do estuário do Porto de Sydney, na Austrália, mostrou que as concentrações de HPAs variaram entre < 100 a $380.000\mu\text{g}/\text{Kg}$ e sua distribuição espacial sugeriu que derivavam principalmente de despejos urbanos. No entanto puderam identificar dois locais onde a contaminação parecia ser devida a fontes fixas. Os autores apontam que, de uma forma geral, o padrão de contaminação da área como um todo é típico de HPAs produzidos em

processos de combustão a altas temperaturas, que geram grande abundância de compostos de alto peso molecular (moléculas com mais de três anéis), como fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzofluorantenos, indeno(1,2,3-cd)pireno e benzo(ghi)perileno (McCready *et al*, 2000).

Concentrações de HPAs ao longo de uma região de mangues e de uma região estuarina vizinha em Hong Kong, apresentaram valores que variaram de 630 a 960 $\mu\text{g/Kg}$ e 180 a 830 $\mu\text{g/Kg}$, respectivamente (Zheng *et al*, 2002). Os resultados deste estudo indicaram que os HPAs encontrados apresentaram distribuição uniforme pelas regiões avaliadas e que têm origem eminentemente pirogênica, assim como no trabalho realizado na Austrália.

Randerath *et al*, 1999, encontraram valores de 1.600.000 $\mu\text{g/Kg}$; 568.000 $\mu\text{g/Kg}$ e 2.185.000 $\mu\text{g/Kg}$ de HPAs totais nas três regiões estudadas, com valores de 46.500 $\mu\text{g/Kg}$, 14.100 $\mu\text{g/Kg}$ e 10.300 $\mu\text{g/Kg}$, respectivamente, de benzo(a)pireno. Observa-se que, no estudo realizado por estes autores, o local com maior concentração de HPAs não corresponde à maior potência encontrada para o teste de Ames. Isto também foi verificado por Suzuki *et al* (1982) e Grifoll *et al* (1990) e corrobora os resultados obtidos neste trabalho. A mutagenicidade encontrada nas réplicas do Ponto 5, por exemplo, não se associa diretamente às concentrações de HPAs totais encontradas, isto é, nem sempre onde há a maior concentração de HPAs há a maior potência genotóxica. Segundo White (2002), a atividade genotóxica de uma mistura complexa é em geral muito mais baixa do que o esperado, se fôssemos considerar efeitos aditivos para cada um dos HPAs que compõem determinada amostra. Outros compostos genotóxicos poderiam também estar presentes, como amins aromáticas e nitrocompostos, para os quais o teste de Ames é também bastante sensível. Para verificar se a mutagenicidade encontrada estaria associada a esta classe de compostos, poder-se-ia utilizar as linhagens YG (Watanabe *et al*, 1989, 1990; Hagiwara *et al*, 1993), que foram especialmente desenvolvidas para este fim.

A avaliação da qualidade dos sedimentos de várias regiões do rio Pó na Itália (Viganò *et al*, 2003) mostrou valores de HPAs totais da ordem de 500 $\mu\text{g/Kg}$ em regiões consideradas pouco contaminadas e identificou dois sítios mais contaminados com valores de cerca de 1500 $\mu\text{g/Kg}$ de HPAs totais, que são ainda

menores que as concentrações encontradas em sedimentos do Rio Sena, na França, que variaram geralmente entre 2000 e 4000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Ollivon *et al*, 1995). Este trabalho localizou um local contaminado, onde foi detectada uma concentração de HPAs totais de 60 $\mu\text{g}/\text{g}$, além de outros parâmetros também alterados, como metais e composição granulométrica. Não foram realizadas análises de mutagenicidade nestes estudos.

Se considerarmos, como Viganò *et al* (2003), o valor de 500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de HPAs totais como limite para distinguir áreas contaminadas e não contaminadas, identificaríamos em nosso estudo os pontos 2,3,12,14 e 18 como não (ou pouco) contaminados. No entanto, como foi detectada atividade mutagênica no ponto 3, e observamos respostas negativas para os pontos 1, 4 e 10, apenas este valor não pode ser utilizado em nosso estudo para diferenciar os locais quanto à sua contaminação. Analisando apenas os HPAs genotóxicos, também seria esperado obter resultados positivos para os pontos 1,4 e 10.

Outros ensaios biológicos poderiam ser realizados utilizando-se organismos biomarcadores, na avaliação de locais impactados. A detecção da genotoxicidade pelo uso do ensaio cometa em moluscos expostos a sedimentos estuarinos contaminados foi reportada como uma boa estratégia (Coughlan *et al*, 2002), porém os autores relatam diferenças encontradas entre os tecidos analisados. Bombail *et al* (2001) mostram, em seu trabalho com peixes, que não houve correlação entre a contaminação e o dano no DNA observado no ensaio cometa, pois verificaram danos também em animais que viviam em áreas de referência. Importante também considerar na utilização de peixes como biomarcadores de exposição que eles podem se adaptar às más condições de um local contaminado, como mostram Nacci *et al* (2002), que estudaram a resistência de peixes estuarinos expostos cronicamente a HPAs. O mecanismo pelo qual estes organismos se protegem, segundo os autores, está relacionado à redução de processos de biotransformação de HPAs, porém isto pode de alguma maneira ter consequências na saúde e reprodução destes animais.

Ensaio de toxicidade crônica realizados por Prósperi (2002) com *Lytechinus variegatus* expostos à água intersticial destes sedimentos mostraram também diferenças entre as respostas de desenvolvimento embrio-larval destes organismos e

os resultados de genotoxicidade (Tabela 41). Neste trabalho evidenciou-se também o papel da amônia não ionizada como interferente nas respostas destes animais.

Desta maneira, evidencia-se que ensaios biológicos, assim como análises químicas, devem ser analisados cuidadosamente na caracterização da contaminação de sedimentos, sendo que uma avaliação integrada de todas as informações é muito importante. Os resultados deste trabalho, de uma forma geral, sugerem vantagens de se estudar a genotoxicidade destas matrizes, já que podem demonstrar a presença de outros compostos orgânicos mutagênicos associados aos processos industriais das fontes poluidoras. Há que se considerar também, a possibilidade destes agentes genotóxicos terem efeito sobre células germinativas, podendo alterar a prole de organismos autóctones e causar desequilíbrio nas populações (Bickham *et al*, 2000). Ensaio que empregam plantas podem ser de grande utilidade na avaliação da genotoxicidade de solos e sedimentos contaminados, com a vantagem de serem metabolicamente competentes e também poderem fornecer informações sobre os efeitos dos contaminantes sobre as células germinativas (Rodrigues, 1998; Kong & Ma, 1999; Monarca *et al*, 2002).

A aplicação do teste de Ames em amostras de sedimento na avaliação e caracterização da contaminação da Baixada Santista foi importante na medida em que confirmou a alta contaminação da região da bacia de evolução da Cosipa, além de ter evidenciado a necessidade de se complementar os estudos nos sedimentos do Rio Piaçaguera e do Rio Cubatão, para verificar os possíveis compostos responsáveis pela mutagenicidade observada.

No Brasil, o projeto Qualised pode ser considerado como a primeira tentativa de se estipular critérios de qualidade de sedimentos com vistas a proteger a fauna aquática de ecossistemas. Este estudo foi coordenado por pesquisadores da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) e foram caracterizados os sedimentos dos reservatórios Promissão, Bariri, Barra Bonita, Rasgão e Billings, do sistema Tietê, no Estado de São Paulo (Mozeto, 2000; Almeida *et al*, 2002). Neste projeto foi observado um gradiente de concentração de HPAs, da área metropolitana da cidade de São Paulo, onde se localizam os corpos d'água mais degradados (Rasgão e Billings), para as partes central e baixas da bacia hidrográfica, consideradas mais preservadas. As maiores concentrações de HPAs

foram determinadas na represa Billings, chegando a 21.000 μ g/Kg de sedimento seco. Nesta avaliação foi empregada a estratégia metodológica proposta neste trabalho e foram obtidas respostas baixas no teste de Ames para os dois reservatórios mais contaminados, Billings com 250 revertentes/g equivalentes de sedimento para a linhagem TA98, na presença de S9, e 650 revertentes/g equivalentes de sedimento em Rasgão, detectados com a TA100+S9 (Almeida *et al*, 2002). Os resultados negativos de genotoxicidade obtidos no Projeto Qualised, para os reservatórios Barra Bonita, Promissão e Bariri, concordantes com os resultados que obtivemos em Pirapora do Bom Jesus neste trabalho, mostram que os sedimentos da bacia do rio Tietê não estão contaminados com compostos mutagênicos em quantidades detectáveis pelo ensaio utilizado.

Atualmente a caracterização da qualidade dos sedimentos dos corpos d'água do Estado de São Paulo já está sendo realizada no Programa da Rede de Monitoramento das Águas Superficiais do Estado de São Paulo, da agência ambiental estadual, desde 2001. O teste de Ames já é um parâmetro de rotina neste programa devido aos resultados obtidos neste trabalho, que definiram uma metodologia padronizada, assim como foi estabelecido anteriormente para avaliação da genotoxicidade de amostras de água (Umbuzeiro *et al*, 2001). Dentro deste programa foram analisadas seis amostras de sedimento durante o ano de 2002 quanto à genotoxicidade e em 2003 o número de pontos foi ampliado para dezessete. Os locais avaliados pertencem a bacias hidrográficas diferentes, e até o presente não foi evidenciado nenhum local contaminado com compostos genotóxicos. Os resultados de teste de Ames, junto com análises químicas e ecotoxicológicas servirão, no futuro próximo, para a caracterização destes locais e priorização da tomada de ações corretivas e também preventivas por parte do órgão ambiental competente.

A utilização do teste de Ames como teste preliminar na avaliação da contaminação de sedimentos mostrou-se uma ferramenta importante para indicar locais que necessitam de ações prioritárias. Uma vez determinadas as áreas de atenção, outras estratégias metodológicas podem ser adotadas. Empregando o mesmo ensaio, outras linhagens de *Salmonella typhimurium* podem ser usadas, assim como diferentes processos de extração de amostras, que detectem preferencialmente este ou aquele grupo de compostos. O fracionamento dos extratos pode ser utilizado para a indicação das classes de compostos genotóxicos, a serem confirmados por análises químicas.

6. CONCLUSÕES

- Foram observadas variações entre as respostas obtidas com amostras extraídas secas ou *in natura*, e os resultados não indicaram a metodologia de maior ou menor eficiência. Apesar disso, a secagem de amostras de sedimento a 45°C antes da extração orgânica parece ser a melhor alternativa, devido à grande variabilidade do conteúdo de água presente em amostras *in natura*, que pode interferir nos cálculos das potências das mesmas.
- Não se verificou diferença entre as combinações de solventes, diclorometano/acetona e diclorometano/metanol, avaliados para a extração orgânica de amostras de sedimento. A combinação diclorometano/metanol é indicada, por ser tecnicamente mais apropriada.
- Quanto ao teste de Ames, a variação metodológica que emprega a pré-incubação mostrou respostas similares ao método padrão de incorporação em placas.
- No Reservatório de Pirapora do Bom Jesus, o fracionamento dos extratos orgânicos utilizando solventes de polaridades diferentes, assim como o uso de linhagens de *Salmonella typhimurium* adicionais (TA1535, TA1537, TA1538, TA104), foram eficientes na confirmação das respostas negativas para o teste de Ames.
- Secagem de sedimentos a 45°C, seguida de extração orgânica com diclorometano/metanol e realização de teste de Ames empregando-se o método padrão de incorporação em placas, com as linhagens TA98 e TA100, na presença e na ausência de S9, parece ser uma estratégia adequada em estudos de triagem para avaliação da atividade genotóxica de sedimentos.
- Concentrações variando entre 10 e 500mg de sedimento equivalentes por placa são indicadas em estudos de triagem para avaliação da genotoxicidade destas matrizes.

- Dos nove locais avaliados na região da Baixada Santista, três mostraram atividade genotóxica. Os pontos sob influência da Cosipa apresentaram alta atividade mutagênica, especialmente com a linhagem TA100 na presença de ativação metabólica, resposta característica da presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, dentre outros compostos mutagênicos. As amostras dos rios Cubatão e Piaçaguera apresentaram respostas mais baixas de genotoxicidade e os resultados indicam a necessidade de uma melhor caracterização química de amostras destes pontos. O uso de linhagens adicionais no teste de Ames, indicadoras de nitrocompostos e/ou aminas aromáticas, pode ser útil na verificação da possível presença destas classes de compostos nas amostras estudadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, A.; URANO, K. Interactions of sediment contaminants in the testing of mutagenicity. **Water Sci. Tech.**, v. 30, n. 10, p. 139-144, 1994.

AHLF, W.; HOLLERT, H.; NEUMANN-HENSEL, H.; RICKING, M. A guidance for the assessment and evaluation of sediment quality. A German approach based on ecotoxicological and chemical measurements. **J.Soil Sedim.**, v.2, n.1, p.37-42, 2002.

ALBERTINI, S.; GOCKE, E. Plasmid copy number and mutant frequencies in *S.typhimurium* TA102. **Environ. Molec. Mutagen.**, v.12, p.353-363, 1988.

ALMEIDA, F.V.; ROUBICEK, D.A.; JARDIM, W.F.; UMBUZEIRO, G.A. Polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations and mutagenic activity of sediments from the Tietê River watershed (Brazil). VII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia e V Reunião da SETAC Latinoamericana, Vitória, ES, Brasil. Livro de Resumos p. 329, 2002.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of water & wastewater**. 18. Ed. GREENBERG A., CLESCERI, L.S., EATON, A.D. (eds.) U.S.A. APHA, AWWA, WEF. p.826-832, 1992.

AMES, B.N.; DURSTON W.;YAMASAKI, E.; LEE, F. Carcinogens are mutagens: a simple test combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, v. 70, p. 2281-2285, 1973.

AMES, B.N.; McCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/Mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutat. Res.**, v. 31, p.1-16, 1975.

AUERBACH, C. History of research on chemical mutagenesis. In: HOLLAENDER, A. (ed.) **Chemical mutagens: Principles and methods for their detection**, v.3, Plenum: New York, p. 1-19, 1973.

AULETTA, A.;ASHBY J. Workshop on the relationship between short-term test information and carcinogenicity; Williamsburg, Virginia, January 20-23, 1987; **Environ. Molec. Mutag.** , v.11 p.135-145; 1988.

AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L. ; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil. **Toxicology**, v. 181-182, p. 441-446, 2002.

BALCH, G. C.; METCALFE, C. D.; HUESTIS, S. Y. Identification of potential fish carcinogens in sediment from Hamilton Harbour, Ontario, Canada. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 14, n. 1, p.79-91, 1995.

BARRETO, J.C.N. **Caracterização de toxicidade de efluentes de usina siderúrgica mediante bioensaios com microrganismos**. São Paulo, 1995. 93p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo).

BICKHAM, J.W.; SANDHU, S.; HEBERT, P.D.N.; CHIKHI, L.; ATHWAL, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutat. Res.** v. 436, p.33-51, 2000.

BOMBARDIER, M.; BERMINGHAM, N.; LEGAULT, R.; FOUQUET, A. Evaluation of an SOS-chromotest-based approach for the isolation and detection of sediment-associated genotoxins. **Chemosphere**, v. 42, p. 931-944, 2001.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, p. 383-392, 2001.

BROMAN, D. NÁF, C.; RANNUG, U. Mutagenic effect of extracts from particulate matter collected with sediment traps in the Archipelago of Stockholm and the open Northern Baltic. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.53, p.669-674, 1994.

BRUSICK, D.J.; GOPALAN, H.N.B.; HESELTINE, E.; HUISMANS, J.W.; LÖHMAN, P.H.M. **Assessing the risk of genetic damage**. Botswana, Gaborone: Hodder& Stoughton. 52 p. 1992.

BURGESS, R.M; SCOTT, K.J. The significance of in-place contaminated marine sediments on the water column: processes and effects. In: **Sediment toxicity assessment**, BURTON JR, G.A. (ed.), Boca Raton: Lewis Publ., 1992, p.129-163.

CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**, v.3, p. 351-368, 1992.

CETESB, São Paulo. **Avaliação do grau de contaminação do sedimento ao longo do canal de navegação do porto de Santos**. EYSINK, G. G. J. et al. Relatório Técnico, 32p., 1998.

CETESB, São Paulo. **Exportação de poluentes do Rio Tietê através de espuma**. Relatório Técnico. HATAMURA, E. et al. 21p. 1995.

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

CETESB, São Paulo. **Sistema Estuarino de Santos e São Vicente**. Relatório Técnico. LAMPARELLI, M.C. et al. 178p. 2001.

CLAXTON, L. D. The development, validation, and analysis of *Salmonella* Mutagenicity test methods for environmental situations. In: **Microscale testing in aquatic toxicology-advances, techniques, and practice**, WELLS, P. G.; LEE, K.; BLAISE, C. (eds.), Boca Raton, CRC, 1998.

CLAXTON, L. D.; HOUK, V. S.; HUGHES, T. J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutat. Res.**, v.410, p. 237-243, 1998.

COELHO, M.C.L.S., VALENT, G.U.; COIMBRÃO, C.A.; SATO, M.I.Z; SANCHEZ, P.S. Mutagenicity evaluation of industrial effluents by Ames assay. **Environ. Molec. Mutagen.**, v. 19, suppl. 20, p.11, 1992.

COM Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. **Guidance on a strategy for testing on chemicals for mutagenicity**. London, 36p., 2000.

COMMONER, B.; MADYASTHA, P.; BRONSDON, A.; VITHAYATHIL, A. J. Environmental mutagens in urban air particulates. **J. Toxicol. Environ. Health**, v.4, p.59-77, 1978 .

COUGHLAN, B. M.; HARTL, M. G. J.; O'RELLY, S. J.; SHEEHAN, D.; MORTHERSILL, C.; VANPELT, F. N. A. M.; O'HALLORAN, J.; O'BRIEN, N. M. Detecting genotoxicity using the comet assay following chronic exposure of Manila clam *Tapes semidecussatus* to polluted estuarine sediments. **Marine Poll. Bull.**, v. 44, p. 1359-1365, 2002.

DeMARINI, D.M. Mutagenicity of fractions of cigarette smoke condensate in *Neurospora crassa* and *Salmonella typhimurium*. **Mutat. Res.**, v.88, p. 363-374, 1981.

DURANT, J. L.; HEMOND, H. F.; THILLY, W. G. Determination of mutagenicity in sediments of the Aberjona Watershed using human lymphoblast and *Salmonella typhimurium* mutation assays. **Environ. Sci. Technol.**, v. 26, p. 599-608, 1992.

DURANT, J. L.; THILLY, W. G.; HEMOND, H. F.; LAFLEUR, A.. L. Identification of the principal human cell mutagen in an organic extract of a mutagenic sediment. **Environ. Sci. Technol.**, v. 28, p. 2033-2044, 1994.

DUTKA, B. J.; TEICHGRÄBER, K.; LIFSHITZ, R. A modified SOS-chromotest procedure to test for genotoxicity and cytotoxicity in sediments directly without extraction. **Chemosphere**, v.31, n. 5, p. 3273-3289, 1995.

ENVIRONMENT CANADA Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life, 2002. Disponível em: <http://www.ec.gc.ca/cegg-rcqe/English/Cegg/Sediment/default.cfm#pro> Acesso em 09 de abril de 2003.

FABACHER, D. L.; SCHMITT, C. J.; BESSER, J. M. Chemical characterization and mutagenic properties of polycyclic aromatic compounds in sediment from tributaries of the Great Lakes. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 7, p.529-543, 1988.

FAIRBAIN, D.W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.**, v. 339, p.37-59, 1995.

FERNÁNDEZ, P.; GRIFOLL, M.; SOLANAS, A. M.; BAYONA, J. M.; ALBAIGÉS, J. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxicity components in Coastal sediments. **Environ. Sci. Technol.**, v. 26, p. 817-829, 1992.

FETTERMAN B. A. ; KIM B. S. ; MARGOLIN B. H.; SCHILDCROUT J. S.; SMITH M. G.; WAGNER S. M.; ZEIGER E. Predicting rodent carcinogenicity from mutagenic potency measured in the Ames Salmonella assay. **Environ. Molec. Mutag.** v.29. p.312 - 322 ;1997.

GAGNE, F.; PARDOS, M.; BLAISE, C.; TURCOTTE, O.; QUÉMERAIS, B; FOUQUET, A. Toxicity evaluation of organic sediment extract resolved by size exclusion chromatography using rainbow trout hepatocytes. **Chemosphere**, v. 39, n. 9, p. 1545-1570, 1999.

GAGNE, F.; TROTTIER, S.; BLAISE, C.; SPROULL, J.; ERNEST B.; Genotoxicity of sediment extract obtained in the vicinity of a creosote-treated wharf to rainbow trout hepatocytes. **Toxicol. Letters**, v. 78, p. 175-182, 1995.

GATEHOUSE, D.; HAWORTH, S.; CEBULA, T.; GOCKE, E.; KIER, L.; MATSUSHIMA, T.; MELCION, C.; NOHMI, T.; OHTA, T.; VENITT, S.; ZEIGER, E. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. **Mutat. Res**, v.312, p.217-233, 1994.

GOLLAPUDI, B.B.; KRISHNA, G. Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. **Mutat. Res.**, v. 455, p.21-28, 2000.

GRIFOLL, M.; SOLANAS, A. M.; BAYONA, J. M. Characterization of genotoxic compounds in the sediments by mass spectrometric techniques combined with *Salmonella*/microsome test. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 19, p. 175-184, 1990.

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.**, v.291, p. 171-180, 1993.

HO, K. T. Y.; QUINN, J. G. Bioassay-directed fractionation of organic contaminants in a estuarine sediment using the new mutagenic bioassay, Mutatox. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 12, p.823-830, 1993.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents- a review. **Mutat. Res.**, v.277, p.91-138, 1992.

HOUK, V.S. & WATERS, M.D. Genetic toxicology and risk assessment of complex environmental mixtures. In: **Human Risk Assessment**, FAN, A. N.; CHANG, I. W. . (eds.), New York: Marcel Dekker, 55pp, 1996.

JARVIS, A. S.; HONEYCUTT, M. E.; McFARLAND, V. A.; BULICH, A. A.; BOUNDS, H. C. A comparison of the Ames assay and mutatox in assessing the mutagenic potential of contaminated dredged sediment. **Eco. Environ. Safety**, v. 33, p. 193-200, 1996.

JOSEPHY, P. D.; GRUZ, P.; NOHMI, T. Recent advances in the construction of bacterial genotoxicity assays. **Mutat. Res.**, v.386, p.1-23, 1997.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H.; THEOBALD, N. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutat. Res.**, v. 498, p. 67-77, 2001.

KAMMANN, U.; RIGGERS, J. C.; THEOBALD, N.; STEINHART, H. Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea. **Mutat. Res.**, v. 467, p. 161-168, 2000.

KATAOKA H.; HAYATSU, T.; HIETSCH, G.; STEINKELLNER, H.; NISHIOKA, S.; NARIMATSU, S.; KNASMULLER, S.; HAYATSU, H. Identification of mutagenic heterocyclic amines (IQ, Trp-P-1 and AαC) in the water of the Danube River, **Mutat. Res.**, v. 466, p. 27- 35, 2000.

KNEZOVICH, J. P.; HARRISON, F. L.; WILHELM, R. The bioavailability of sediment-sorbed organic chemicals: a review. **Water Air Soil Poll.**, v. 32, p. 233-245, 1987.

KONG, M.S.; MA, T.H. Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays. **Mutat. Res.**, v.426, p. 221-228, 1999

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.** v.30, n.3, p. 287-306, 2000.

KUBO, T.; URANO, K.; UTSUMI, H. Mutagenicity characteristic of 255 environmental chemicals. **J. Health Sci.**, v. 48, n. 6, p.545-554, 2002.

LA POINT, T.W; FAIRCHILD, J.F. Evaluation of sediment contaminant toxicity: the use of freshwater community structure. In: **Sediment Toxicity assessment**, BURTON JR, G. A. (ed.). Boca Raton: Lewis Publ., 1992, p. 87-110.

LAMOUREUX, E. M.; BROWNAWELL, B. J. Chemical and biological availability of sediments-sorbed hydrophobic organic contaminants. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 18, n. 8, p.1733-1741, 1999.

LEE II, H. Models, muddles and mud: predicting bioaccumulation of sediment-associated pollutants. In: **Sediment toxicity assessment**, BURTON JR, G. A. (ed.). Boca Raton: Lewis Publ., 1992, p. 267-293.

MACCUBBIN, A. E.; ERSING, N. Mutagenic potential of sediments from the Grand Calumet river. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 47, p. 308-315, 1991.

MACCUBBIN, A. E.; ERSING, N.; FRANK, M. E. Mutagenicity of sediments from the Detroit river. **J. Great Lakes Res.**, v. 17, n. 3, p. 314-321. 1991.

MaCGREGOR J.T.;CASCIANO D.;MÜLLER L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risk. **Mutat. Res.** v.455.p.3-20, 2000.

MALACHOVA, K. Using short-term mutagenicity tests for the evaluation of genotoxicity of contaminated soils. **J. Soil Contam.**, v.8, n. 6, p.667-680, 1999.

MALLING, H. V. Dimethylnitrosoamine: Formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsomes. **Mutat. Res.**, v.13, p. 425 – 429, 1971.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutat. Res.**, v.113, p.173-215, 1983.

MARVIN, C. H.; McCARRY, B. E.; LUNDRIGAN, J. A.; ROBERTS, K.; BRYANT, D. W. Bioassay-directed fractionation of PAH of molecular mass 302 in coal tar-contaminated sediment. **Sci. Total Environ.**, v 231, p. 135-144, 1999.

MARVIN, C.H.; ALLAN, L. M.; McCARRY, B. E.; BRYANT, D. W. Chemico/biological investigation of contaminated sediment from the Hamilton Harbour area of western lake Ontario. **Environ. Molec. Mutagen.**, v. 22, p. 61-70, 1993.

MARVIN, C.H.; McCARRY, B. E.; VILLELLA, J. ; ALLAN, L. M.; BRYANT, D. W. Chemical and biological profiles of sediments as indicators of sources of contamination in Hamilton Harbour. Part II: Bioassay-directed fractionation using the Ames *Salmonella*/microsome assay. **Chemosphere**, v. 41, p. 989-999, 2000.

MCCANN, J, E. CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B.N.. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test, assay of 300 chemicals. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, v.72, p.5135-5139, 1975.

McCREADY, S.; SLEE, D. J. BIRCH, G. F.; TAYLOR, S. E. The distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surficial sediments of Sydney Harbour, Australia. **Marine Poll. Bull.**, v. 40, n. 11, p. 999-1006, 2000.

METCALFE, C.D.; BALCH, G.C. Carcinogenic and genotoxic activity of extracts from contaminated sediments in western lake Ontario. **Sci. Total Environ.**, v 94, p. 125-141, 1990.

MINISSI, S.; CACCESE, D.; PASSFIUME, F.; GRELLA, A.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Mutagenicity (micronucleus test in *Vicia faba* root tips), polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metal content of sediments collected in Tiber river and its tributaries within the urban area of Rome. **Mutat. Res.**, v. 420, p. 77-84, 1998.

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

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutat. Res.**, v.455, p.29-60, 2000.

MOZETO, A. Qualised bases técnico-científicas para desenvolvimento de critérios de qualidade de sedimentos, 2000. Disponível em: <http://www.lavoisier.dq.ufscar.br/labs/biogeoquimica/qualised.htm> Acesso em 09 de Abril de 2003.

MURAKAMI, D.; ROUBICEK. D.A.; COIMBRÃO, C.A.; STRAUS, E.L.; VALENT, G.U. Genotoxicity of textile industries sludges using the Ames test. **Genetics Molec. Biol.**, v. 21 suppl., p.125, 1998.

NACCI, D. E.; KOHAN, M.; PELLETIER, M.; GEORGE, E. Effects of benzo[a]pyrene exposure on a fish population resident to the toxic effects of dioxin-like compounds. **Aquatic Toxicol.**, v. 57, p. 203-215, 2002.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, NTP, 2003. **NTP Study results comparisons.** Disponível em http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/Carc_SA/NTP_Res_Compare.html. Acesso em 28 maio 2003.

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. **Química Nova**, v. 23, n. 6, p. 765-773, 2000.

OISHI, S.; TAKAHASHI, O. Mutagenicity of Tama river sediment. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 39, p. 696-700, 1987.

OLLIVON, D.; GARBAN, B.; CHESTERIKOFF, A. Analysis of the distribution of some polycyclic hydrocarbons in sediments and suspended matter in the river Seine (France). **Water Air Soil Poll.**, v. 81, p. 135-152, 1955.

PAPOULIAS, D. M.; BUCKLER, D. Mutagenicity of Great Lakes sediments. **J. Great Lakes Res.**, v. 22, n. 3, p. 591-601, 1996.

PAPOULIAS, D. M.; BUCKLER, D.; TILLITT, D. E. Optimization of the Ames/Salmonella Mutagenicity assay for use with extracts of aquatic sediments. **J. Great Lakes Res.**, v. 22, n. 3, p. 584-590, 1996.

PICER, M.; KOVAC T.; BRITVIC, S.; PICER, N. The chemical and biogenotoxic characterization of organic xenobiotics in aquatic sediment materials. 1. The application and comparison of chemically non-specific and biogenotoxic methods. **Chemosphere**, v. 44, p. 1673-1683, 2001.

POWER, E.A.; CHAPMAN, P.M. Assessing sediment quality. In: **Sediment toxicity assessment**, BURTON JR, G.A. (ed.), Boca Raton: Lewis Publ., 1992, p.1-18.

PRÓSPERI, V.A. & ROUBICEK, D.A. Avaliação da Qualidade de Sedimentos, 2002.

PRÓSPERI, V. A . **Comparação de métodos ecotoxicológicos na avaliação de sedimentos marinhos e estuarinos**. São Carlos, 2002. 119p. (Tese de Doutorado-Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo).

PRÓSPERI, V. A. ; ROUBICEK, D. A. **Contaminação de sedimentos e estudos de caso: critério de qualidade de sedimento**. Apostila do curso apresentado no 5º Encontro Nacional de Engenharia de Sedimentos. São Paulo, 2002, 5p.

PURCHASE, I. F. H.; LONGSTAFF, E.; ASHBY, J. ; STYES, J. A.; ANDERSON, D.; LEFEVRE, P.A.; WESTWOOD, F. R. An evolution of short term tests for detecting organic chemical carcinogens. **Br. J. Cancer.**, v.37, p.873 – 959, 1978.

QUILLARDET, P.; HUISMAN, O.; D'ARI, R.; HOFFNUNG, M. SOS - chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K12 to measure genotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, v. 79, p. 5971 – 5975, 1982.

RANDERATH, K.; RANDERATH, E.; ZHOU, G. D.; SUPUNPONG, N.; HE, L. Y.; McDONALD, T. J.; DONNELLY, K.C. Genotoxicity of complex PAH mixtures recovered from contaminated lake sediments as assessed by three different methods. **Environ. Molec. Mutagen.**, v. 33, p. 303-312, 1999.

RANDOW, F.F.E.; HÜBENER, T.; MERKEL, G. Hazards for the Rostock water supply from a tar-contaminated sediment in the River Warnow. **Toxicol. Letters**, v.88, p.355-358, 1996.

RODRIGUES, G.S. Bioensaios de toxicidade genética com plantas superiores *Tradescantia* (MCN e SHM), milho e soja. V Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia e I Colóquio Brasileiro de Algas Nocivas, Itajaí, SC, Brasil. Livro de Resumos p. 15-16, 1998.

ROUBICEK, D.A.; KUMMROW, F. & UMBUZEIRO, G.A. – Perfil da atividade mutagênica de águas tratadas da região metropolitana de São Paulo, através do uso do teste de Ames. VII Semana de Ciência e Tecnologia da FCF-USP e XVII Seminário de Pós Graduação, São Paulo, SP, Brasil. **Revista Bras. Cienc. Farm.**, v. 38, suppl. 1, p.13, 2002.

ROUBICEK, D.A.; RODRIGUES, T.M.; CARMO, E.V.S.; COIMBRÃO, C.A.; VALENT, G.U. Strategies to assess genotoxicity of estuarine contaminated sediments using the Ames test. **Genetics Molec. Biol.**, v.21, suppl., p.124, 1998.

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

SANCHEZ, P.S.; COIMBRÃO, C. A.; COELHO, M. C. L. S.; VALENT, G. U.; SATO, M. I. Z. Assessment of mutagenic activity in drinking water from São Paulo, Brazil. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, v.7, p.141-155, 1992.

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

SATO, T.; MOMMA, T.; OSE, Y.; ISHIKAWA, T.; KATO, K. Mutagenicity of Nagara river sediment. **Mutat. Res.**, v. 118, p. 257-267, 1983.

SILVA, M. **Fungos filamentosos isolados de sedimentos estuarinos que metabolizam hidrocarbonetos aromáticos policíclicos**. Campinas, 2002. 90p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas).

SIMMON, V. F. *In vitro* mutagenicity assays of chemical carcinogens and related compounds with *Salmonella typhimurium*. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 62, p.893-899, 1979.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v.175, p. 184-191, 1988.

STOPPE, N.C.; ROUBICEK, D.A.; COIMBRÃO, C.A.; SATO, M.I.Z.; VALENT, G.U. Mutagenicity of chlorinated drinking water from two water treatment plants (WTP) of São Paulo metropolitan area. **Genetics Molec. Biol.**, v.21, suppl, p.125, 1998.

SUGIMURA, T.; SATO, S.; NAGAO, M.; JAHAGI, T.; MATSUSHIMA, T.; SEINO, Y.; TAKEGUCHI, M. Overlapping of carcinogens and mutagens. In: **Fundamentals in Cancer Prevention**, MAGEE, P.N.; TAKAYAMA, S.; SUGIMURA, T.; MATSUSHIMA, T. (eds.). Baltimore: University Park Press., 1976, p. 191 – 215.

SUZUKI, J.; SADAMASU, T.; SUZUKI, S. Mutagenic activity of organic matter in an urban river sediment. **Environ. Poll. (series A)**, v. 29, p. 91-99, 1982.

SWIFT, M.C.; CANFIELD, T.J.; LA POINT, T.W. Sampling benthic communities for sediment toxicity using grab samplers and artificial substrates. **J. Great Lakes Res.**, v.22, n.3, p.557-564, 1996.

THOMAS, K. V.; BALAAM, J.; BARNARD, N.; DYER, R.; JONES, C.; LAVENDER, J.; MCHUGH, M. Characterization of potentially genotoxic compounds in the sediments collected from United Kingdom estuaries. **Chemosphere**, v. 49, p. 247-258, 2002.

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 20-year survey. **Mutat. Res.**, v. 491, p. 119-126, 2001.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, U.S.EPA, 1985. **Guidelines for preparing environmental and waste samples for mutagenicity (Ames) testing**. Interim Procedures and Panel Meeting Proceedings. Sept. 1985, Las Vegas, EPA. p.255. (EPA 600/07/68-03-3136).

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, U.S.EPA, 1986. Guidelines for mutagenicity risk assessment. **Federal Register**, v. 51, n. 185, p. 34006-34012, Washington DC (EPA/630/R-98/003).

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, U.S.EPA, 2002. **Introduction to contaminated sediments.** Disponível em <http://www.epa.gov/ost/cs/aboutcs/index.html> . Acesso em 08 maio 2003.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, U.S.EPA., 1995. Great Lakes program office, **detection of genotoxicity in contaminated sediments: an evaluation of a new test for complex environmental mixtures.** Disponível em <http://www.epa.gov/glnpo/arcs/genotox.html> . Acesso em 12 mar. 2003.

VALENT, G. U.; SATO, M.I.Z.; COELHO, M.C.L.S.; COIMBRÃO, C.A.; SANCHEZ, P.S.; MARTINS, M.T.; BONATELLI JR., R. Monitoring São Paulo State rivers in Brazil for mutagenic activity using the Ames test. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, v.8, p.371-381, 1993.

VIGANÒ, L.; ARILLO, A.; BUFFAGNI, A.; CAMUSSO, M.; CIANNARELLA, R.; CROSA, G.; FALUGI, C.; GALASSI, S.; GUZZELLA, L.; LOPEZ, A.; MINGAZZINI, M.; PAGNOTTA, R.; PATROLECCO, L.; TARTARI, G.; VALSECCHI, S. Quality assessment of bed sediments of the Po river (Italy). **Water Res.**, v. 37, p.501-518, 2003.

VIGANÒ, L.; CAMOIRANO, A.; IZZOTTI, A.; D'AGOSTINI, F.; POLESELLO, S.; FRANCISCI, C.; DE FLORA, S. Mutagenicity of sediments along the Po river and genotoxicity biomarkers in fish from polluted areas. **Mutat. Res.**, v. 515, p. 125-134, 2002.

WATANABE, M.; ISHIDATE JR., M.; NOHMI, T. Sensitive method for the detection of mutagenic nitrorarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels. **Mutat. Res.**, v.234, p. 337-348, 1990.

WATANABE, M.; ISHIDATE JR., M.; NOHMI, T. A sensitive method for the detection of mutagenic nitrorarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. **Mutat. Res.**, v.216, p. 211-220, 1989.

WATERS, M. D.; STACK H.F.; JACKSON M. A. ; Genetic toxicology data in the evaluation of potencial human environmental carcinogens. **Mutat. Res.** v.437. p.21-49 ;1999.

WEISBURGER, J.H. Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now. **Mutat. Res.** v.437, p.105-112, 1999.

WEST,W. R.; SMITH, P.A.; BOOTH. G. M.; WISE, S. A.; LEE, M. L. Determination of genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons in a sediment from the Black River (Ohio). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 15, p. 21-249, 1986.

WEST,W. R.; SMITH, P.A.; BOOTH. G. M.; WISE, S. A.; LEE, M. L. Isolation and detection of genotoxic components in a black river sediment. **Environ. Sci. Technol.**, v. 22, p. 224-228, 1988.

WHITE, P. A. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. **Mutat. Res.** v.515, p.85-98, 2002.

WHITE, P. A.; CÔTÉ, C. Investigating the sources and fate of genotoxic substances in aquatic ecosystems with the SOS chromotest. In: **Microscale testing in aquatic toxicology-advances, techniques, and practice**, WELLS, P. G.; LEE, K.; BLAISE, C. (eds.), Boca Raton, CRC, 1998.

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B.; BLAISE, C. Genotoxic substances in the St. Lawrence system I: industrial genotoxins sorbed to particulate matter in the St. Lawrence, St. Maurice, and Saguenay rivers, Canada. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 17, n. 2, p.286-303, 1998a.

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B.; BLAISE, C. Genotoxic substances in the St. Lawrence system II: extracts of fish and macroinvertebrates from the St. Lawrence and Saguenay rivers, Canada. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 17, n. 2, p.304-316, 1998b.

WHITE, P.A.; DeMARINI, D.M. Water-borne mutagens. In: **Environmental Medicine**, MÖLLER, L. (ed.), Stockholm, Joint Industrial Safety Council/Sweden, 2000.

WOLSKA, L.; ZYGMUNT, B.; NAMIESNIK, J. Organic pollutants in the Odra river ecosystem. **Chemosphere**, in press, 2003.

WÜRGLER, F. E.; KRAMERS, P. G. N. Environmental effects of genotoxins (eco-genotoxicology). **Mutagenesis**, v.7, n. 5, p.321-327, 1992.

ZHENG, G. J.; MAN, B. K. W.; LAM, J. C. W.; LAM, M. H. W.; LAM, P. K., S. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of a sub-tropical coastal wetland. **Water Res.**, v. 36, p. 1457-1468, 2002.