

---

Ciências Biológicas

---

**ANA CAROLINA AMARAL PEREIRA**

**EFICIÊNCIA DAS RESINAS XAD4 E C<sub>18</sub> NA  
EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS MUTAGÊNICOS  
PRESENTES EM EFLUENTE DE REFINARIA  
DE PETRÓLEO PARA A REALIZAÇÃO DO  
TESTE DE AMES.**

Rio Claro  
2010

ANA CAROLINA AMARAL PEREIRA

EFICIÊNCIA DAS RESINAS XAD4 E C<sub>18</sub> NA EXTRAÇÃO DE  
COMPOSTOS MUTAGÊNICOS PRESENTES EM EFLUENTE DE  
REFINARIA DE PETRÓLEO PARA A REALIZAÇÃO DO TESTE DE  
AMES.

Orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis

Co-orientador: Dilza A. Nalin

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Biociências da Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -  
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de  
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2010

576

Pereira, Ana Carolina Amaral

P436e

Eficiência das resinas XAD4 e C18 na extração de compostos mutagênicos presentes em efluente de refinaria de petróleo para a realização do Teste de Ames. / Ana Carolina Amaral Pereira. - Rio Claro : [s.n.], 2010

42 f. : il., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis

Co-Orientador: Dilza A. Nalin

1. Microorganismos. 2. Teste de Ames. 2. Mutagenicidade. 3. Teste de Salmonella / microsossoma. 4. Genotoxicidade. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	4
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	6
2.2	Teste de Ames.....	8
2.3	Características de efluente de refinaria.....	10
2.4	Métodos de extração .....	11
2.4.1	Extração em fase sólida .....	12
2.4.2	Mecanismos de separação .....	13
2.4.3	XAD4 e C <sub>18</sub> .....	14
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1	Amostragem.....	16
3.2	Extração .....	16
3.2.1	Resina XAD4.....	16
3.2.2	Resina C <sub>18</sub> .....	17
3.3	Teste de Ames.....	18
3.3.1	Microrganismo indicador .....	18
3.3.2	Verificação – Provas genéticas.....	18
3.3.3	Taxa de reversão espontânea .....	19
3.3.4	Teste de viabilidade .....	20
3.3.5	Procedimento do ensaio.....	20
3.3.6	Análise e interpretação dos resultados.....	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1	Provas genéticas.....	23
4.2	Taxa de reversão espontânea .....	24
4.4.1	Considerações gerais .....	24
4.4.2	Atividade mutagênica.....	32
4.4.3	Efeito do sistema de metabolização (mistura S9).....	32
4.4.4	Análise da mutagenicidade através das duas cepas utilizadas.....	32
4.4.5	Comparação entre as resinas C <sub>18</sub> e XAD4.....	33
5	CONCLUSÕES .....	35
6	ETAPAS A SEREM CONCLUÍDAS .....	36
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37
8	ASSINATURAS.....	42

## 1 INTRODUÇÃO

O efluente gerado pela atividade de refinarias de petróleo é uma mistura complexa cujas características dependem dos tipos de processos empregados no refino. No geral, os constituintes presentes neste efluente são: hidrocarbonetos, inclusive policíclicos aromáticos (HPA), dioxinas, metais, fenóis, amônia e compostos de enxofre.

Os efeitos genotóxicos dos derivados de petróleo e efluente de refinarias já são conhecidos (LEME; MARIN-MORALES, 2007; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2008; RODRIGUES, 2007). Uma das formas utilizadas para a detecção dos efeitos mutagênicos de amostras é o Teste de Ames.

No Teste de Ames são utilizadas diferentes linhagens da bactéria *Salmonella typhimurium* derivadas da parental LT2, que apresentam diferentes mutações no operon da histidina, sendo auxotróficas para este aminoácido. Estando a bactéria em meio mínimo (sem histidina), no qual as linhagens mutantes não conseguem crescer, apenas as revertentes serão capazes de se desenvolver, ou seja, aquelas que, por meio de mutações, recuperaram sua capacidade de síntese deste aminoácido. A quantificação dos revertentes é feita contando-se as colônias que cresceram em meio mínimo (RIBEIRO et al., 2003).

Ao expor uma população de bactérias à amostra a ser testada é possível determinar a taxa de reversão causada pela substância. A partir daí é possível analisar se a substância teste apresenta atividade mutagênica ou não.

Porém, muitas vezes os compostos mutagênicos apresentam-se muito diluídos na amostra, de tal maneira que não são detectáveis em sua concentração original. Isso acontece, por exemplo, em amostras de água de rio.

Por este motivo, o uso de técnicas de extração e concentração de amostras torna-se essencial. Uma destas técnicas é a extração em fase sólida, com a utilização de resinas que adsorvem diferencialmente os compostos da amostra.

Nesta técnica, as amostras são aplicadas sobre a resina, a qual apresenta adsorção seletiva, sendo os compostos de interesse recuperados posteriormente por meio da extração. Para o Teste de Ames, a resina recomendada é a XAD4. Trata-se de uma resina não iônica, polimérica de estireno-divinilbenzeno. Pereira et al. (2007), Valente-Campos et al. (2009) entre outros autores identificaram compostos mutagênicos aplicando o Teste de Ames em amostras concentradas com a utilização da resina XAD4.

A resina denominada C<sub>18</sub> utiliza o método de partição, apresenta estrutura de sílica gel onde está ligado o radical octadecilsilano. Vários trabalhos apontam para a viabilidade de utilização desta resina para a extração de compostos mutagênicos (LIMA, 2008; FARIA, 2004; RICHLING et al., 1998).

Uma vez que o Teste de Ames não identifica os compostos presentes na amostra e que diferentes tipos de resinas são capazes de extrair diferentes tipos de substâncias, é muito importante que seja definido qual a resina mais eficiente para cada tipo de amostra a ser testada por este método.

Nesta situação, em que o efluente de refinaria está sendo analisado, é necessário esclarecer experimentalmente qual a resina é mais conveniente para concentração das substâncias de interesse para análise de mutagenicidade.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Mutagenicidade

Substâncias mutagênicas ou genotóxicas são aquelas capazes de induzir mutações, ou seja, alterações na sequência de bases do ácido nucléico do genoma de um organismo (MADIGAN et al., 2010).

No genoma, que inclui o código genético, cada conjunto de três nucleotídeos (códon) do DNA (ou RNA<sub>m</sub> correspondente) especifica um aminoácido no polipeptídeo traduzido. Quando ocorrem modificações na sequência de bases do ácido nucléico são ocasionadas modificações na molécula traduzida. Cada códon especifica um único aminoácido, mas cada aminoácido pode ser codificado por mais de um códon.

Segundo Griffiths et al. (2008) as mutações podem ser consideradas cromossômicas ou gênicas. As cromossômicas são relacionadas com alterações estruturais no cromossomo ou alterações no número de cromossomos em uma célula. Por outro lado, as mutações gênicas ocorrem, conforme o próprio nome indica, eventos que ocorrem dentro de genes. Dentre as mutações gênicas, as principais são a mutação por substituição de base e as mutações “indel” (por adição ou deleção de base).

A substituição de um par de bases pode resultar em uma mutação silenciosa (ou sinônima), de sentido trocado ou sem sentido. A primeira não gera alteração na ordem dos aminoácidos traduzidos a partir da fita DNA molde mutada. Isso porque esta mutação muda um códon de um aminoácido por outro códon do mesmo aminoácido. Diferente das mutações de sentido trocado, nas quais o códon mutado codifica um aminoácido diferente do códon não mutado. Nas mutações sem sentido, o códon mutado codifica uma sequência de finalização da transcrição, causando a interrupção da mesma antes do término do gen.

As mutações indel são causadas por adição ou deleção de pares de bases na sequência do DNA. Esta mutação gera a modificação na matriz de leitura, fazendo com que toda a sequência de aminoácidos codificados após a mutação não tenha relação com a sequência original.

Alterações genéticas podem ocorrer espontaneamente nos organismos, sendo que a seleção natural age no sentido de mantê-las ou eliminá-las. Estas alterações podem ser benéficas, maléficas ou neutras, porém a porcentagem de alterações benéficas é muito inferior às maléficas. No caso do ser humano, mesmo pequenas alterações podem causar doenças sérias, mal-formações ou até a morte (BRUSICK, 1980).

As alterações espontâneas ocorrem normalmente a uma taxa muito baixa, sendo que as substâncias mutagênicas aumentam a frequência das mutações. Há muitas evidências que mostram que uma grande proporção de cânceres humanos apresenta causas ambientais, principalmente pela exposição a agentes químicos. Nem sempre um agente mutagênico é um agente cancerígeno, porém há uma correlação muito forte entre eles (MADIGAN et al., 2010).

As mutações desempenham papel fundamental na etapa de iniciação da carcinogênese. O termo carcinogênese significa literalmente a origem de neoplasias epiteliais (carcinomas), porém na prática este termo é utilizado para designar neoplasias em geral (oncogênese), sentido que vai ser mantido neste trabalho (GOMES-CARNEIRO et al., 1997).

A carcinogênese desenvolve-se em duas fases: iniciação e promoção. A iniciação se dá quando uma lesão no DNA não é reparada e é transmitida às células filhas (mutação). A etapa de promoção envolve principalmente a ativação e transcrição de genes. A maioria dos tumores tem origem unicelular e desenvolve-se por expansão clonal, sendo que suas células apresentam vantagens em relação às outras células quanto à sua capacidade proliferativa (AZEVEDO; CHASIN, 2004).

Os efeitos mutagênicos das substâncias podem ser avaliados mediante ensaios com microrganismos os quais avaliam basicamente o dano provocado ao DNA pelo agente tóxico ou pelos seus produtos de biotransformação. Dentre os testes empregados, o mais comum é o teste de mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium*, conhecido como ensaio ou teste de AMES (LARINI, 1997).

## 2.2 Teste de Ames

O Teste de Ames, ou teste de *Salmonella* / microssoma é atualmente o método mais utilizado para detectar atividades genotóxicas em substâncias (RIBEIRO et al., 2003). Este ensaio foi desenvolvido por Bruce Ames e colaboradores na década de 1970, tendo sido aprimorado posteriormente pelo próprio Dr. Ames e por outros pesquisadores (AMES et al., 1973a, 1973b; MARON; AMES, 1983).

O Teste de Ames, como ficou conhecido, vem sendo utilizado na análise de diferentes tipos de amostras e é recomendado por conceituadas entidades governamentais e órgãos de pesquisa nos Estados Unidos, Canadá, assim como diversos países da Europa (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 1994).

Há mais de dez mil publicações relacionadas ao Teste de Ames com dados de milhares de agentes mutagênicos, sendo que este teste pode ser considerado uma ferramenta indispensável na toxicologia do século 21 (CLAXTON et al, 2010).

No teste são utilizadas diferentes linhagens da bactéria *Salmonella typhimurium* derivadas da parental LT2, que apresentam diferentes mutações no operon da histidina, sendo auxotróficas para este aminoácido (RIBEIRO et al., 2003). Cada linhagem pode ser revertida ao tipo selvagem por mutágenos particulares (AMES et al., 1973b). Inoculando-se a bactéria em meio mínimo (sem histidina), no qual as linhagens mutantes não conseguem crescer, apenas as revertentes serão capazes de se desenvolver, ou seja, aquelas que por meio de mutações recuperaram sua capacidade de síntese deste aminoácido. A quantificação dos revertentes é feita contando-se as colônias que cresceram em meio mínimo (RIBEIRO et al., 2003).

*S. typhimurium* é capaz de apresentar reversão espontânea a taxas relativamente baixas. Ao expor uma população de bactérias à amostra a ser testada é possível comparar o número de revertentes espontâneos esperados (controle negativo) e a taxa de reversão causada pela substância. Com os dados obtidos, é possível analisar se a substância testada apresenta atividade mutagênica ou não.

Apesar da metodologia do Teste de Ames não permitir identificar os contaminantes presentes na amostra, a utilização de diferentes métodos de extração e diferentes linhagens de *Salmonella* pode auxiliar na identificação da classe dos mutágenos presentes (UMBUZEIRO et al., 2004).

Mutantes de *S. typhimurium* utilizados no teste são capazes de detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura e substituições dos pares de bases no DNA. Cada linhagem apresenta características distintas que permitem detectar a atividade mutagênica em grupos específicos de substâncias. A tabela 1 apresenta algumas características das linhagens utilizadas.

**Tabela 01: Cepas de *S. typhimurium* utilizadas no teste**

Linhagem	Alvo da mutação	Taxa de reversão espontânea	Deteção
TA 1537	CG	5-25	Deslocamento do quadro de leitura no DNA
TA 1538	CG	15-35	Deslocamento do quadro de leitura no DNA
TA 97 <sup>a</sup>	CG	90-180	Deslocamento do quadro de leitura no DNA
TA 98	CG	25-75	Deslocamento do quadro de leitura no DNA
TA 1535	GC	25-35	Substituição de pares de base do DNA
TA 100	GC	75-225	Substituição de pares de base do DNA
TA 102	AT	240-320	Substituição de pares de base do DNA
TA 104	AT	245-475	Substituição de pares de base do DNA
TA 98 NR	GC	25-75	Nitrocompostos transformados pelas redutases bacterianas
TA 98/1,8DNP <sub>6</sub>	GC	25-75	Nitrocompostos transformados pelas redutases bacterianas

Fonte: Modificado de COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 1994.

As linhagens TA98 e TA100 são as mais utilizadas para triagem, sendo consideradas eficientes na detecção de numerosas substâncias mutagênicas. Outras linhagens conhecidas podem ser utilizadas, dependendo do objetivo do estudo (RIBEIRO et al., 2003).

Além das características apresentadas, as linhagens de *Salmonella* utilizadas no teste apresentam outras mutações que aumentam a sensibilidade na detecção dos agentes mutagênicos.

A mutação *rfa*, presente em todas as linhagens, que causa perda parcial da barreira lipopolissacarídica, facilita a difusão de moléculas grandes para dentro da célula. O gene *uvrB* é um dos responsáveis pelo reparo por excisão. A deleção deste gene, presente na maioria das linhagens, proporciona elevação do número de lesões no DNA que são reparadas por mecanismos sujeitos a erros. Esta deleção estendeu-se até o gene responsável pela síntese de biotina, causando a dependência da mesma em linhagens que apresentam esta mutação (RIBEIRO et al., 2003).

Além disso, o plasmídeo pKM101 foi introduzido em algumas linhagens, o que aumentou a atividade do sistema de reparo do DNA passível de erro, elevando a mutagênese espontânea e a induzida. Na linhagem TA102 o plasmídeo introduzido foi o hisG428 que aumenta o número de locais específicos para mutagênese (RIBEIRO et al., 2003).

No ensaio do Teste de Ames, é utilizado com frequência um sistema de ativação enzimática (fração S9) composto pela fração microsomal de fígado de rato que permite a avaliação dos metabólitos da substância em teste, ou seja, auxilia na determinação da promutagenicidade da amostra (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 1994). Promutágenos são compostos que não apresentam ação direta sobre o DNA, mas após metabolização no organismo são convertidos em compostos capazes de interagir com o material genético. Como o teste é realizado com e sem ativação enzimática, é possível avaliar se amostra contém tanto mutágenos diretos quanto indiretos.

Atualmente o Teste de Ames é amplamente aceito, podendo ser utilizado para a avaliação da atividade mutagênica de diversos tipos de amostras, como de alimentos (SATO et al., 2008; SEVERIN et al., 2010), subprodutos da desinfecção de água (GUZZELA et al., 2004; KING et al., 2009), água de rio (LIU et al., 2007; OHE et al., 2003, 2008; UMBUZEIRO et al., 2004; VARGAS et al., 2001), sedimentos de rio (UMBUZEIRO et al., 2004), água subterrânea (HUANG et al., 2009; VALENTE-CAMPOS et al., 2009), efluentes (FATIMA; AHMAD, 2006; GUPTA et al., 2009; MONARCA et al., 2000), extratos vegetais (LOH et al., 2009; SISENANDO et al., 2009; VERSCHAEVE; VAN STADEN, 2008), medicamentos e excipientes farmacêuticos (AARDEMA et al., 2008; BRUSICK, 2009), inseticida (ILA et al., 2008), solo (ANSARI; MALIK, 2009; WATANABE et al., 2008), tabaco (RICKERT et al., 2007), entre outros tipos de amostras.

### **2.3 Características de efluente de refinaria**

O efluente gerado pela atividade de refinarias de petróleo é uma mistura complexa cujas características dependem dos tipos de processos empregados no refino e da sua própria origem. No geral, dentre os constituintes presentes neste efluente podem ser citados: hidrocarbonetos, inclusive policíclicos aromáticos (HPA), dioxinas, metais, fenóis, amônia e compostos de enxofre.

Em termos específicos, a caracterização do efluente de uma refinaria de petróleo localizada nos Emirados Árabes Unidos revelou a presença de hidrocarbonetos totais de

petróleo (HTP), hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA), principalmente naftaleno, além de componentes fenólicos, principalmente fenol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, 2,4-dimethylphenol, e bifenilos policlorados (BPC) (ZAROONI; ELSHORBAGY, 2006).

Em uma refinaria localizada na China, foi detectado que altas concentrações de pentilamina e anilina no efluente dificultam o tratamento do mesmo (WANG et al., 2007).

Ainda, em relação à China, foi demonstrado que a concentração de HPA nos sedimentos do Rio Amarelo neste país é afetada pelas descargas de efluentes de refinaria de petróleo assim como de esgoto urbano, e que os HPAs tem origem tanto pirogênica quanto petrogênica (XU et al., 2007).

Atividade genotóxica foi evidenciada em derivados de petróleo como o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (MAZZEO; MARIN-MORALES, 2008) e em HPAs presentes no efluente de uma refinaria (RODRIGUES, 2007).

Ainda, após vazamento de oleoduto no rio Guaecá, São Sebastião, as águas contaminadas por hidrocarbonetos totais de petróleo e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos apresentaram efeitos mutagênicos detectados pelo teste de *Allium cepa* (LEME; MARIN-MORALES, 2007).

Como visto, os efeitos genotóxicos dos derivados de petróleo e efluente de refinarias são conhecidos. Apesar disso, muitas vezes os compostos mutagênicos apresentam-se muito diluídos na amostra, de tal maneira que não são detectáveis.

Uma vez que uma única molécula de um composto mutagênico é capaz de causar alterações no DNA da célula de organismos expostos, é essencial que haja algum processo de concentração das amostras analisadas. Por este motivo, o uso de técnicas de extração e concentração de amostras mostra-se tão importante.

## 2.4 Métodos de extração

Alguns métodos de extração de substâncias presentes em pequenas quantidades podem ser utilizados no preparo das amostras para a realização do Teste de Ames. Entre eles pode-se citar a extração líquido-líquido (ALEEM; MALIK, 2005; UMBUZEIRO et al., 2004), o blue rayon (KUMMROW et al., 2006; KUMMROW; UMBUZEIRO, 2006; OHE et al., 2003; UMBUZEIRO et al., 2004) e a extração em fase sólida (ALEEM; MALIK, 2005; GRABOW et al., 1981; KUTLU et al., 2007; LIU et al., 2007; SUJBERT et al., 2006).

A extração líquido-líquido baseia-se na solubilidade relativa dos analitos em dois solventes idealmente imiscíveis (LANÇAS, 2004). Por outro lado o blue ayon é um adsorvente composto por um conjunto de fibras de rayon ligadas covalentemente à pigmentos que apresentam a capacidade de adsorver seletivamente compostos policíclicos. A extração dos compostos adsorvidos é efetuada com eluentes específicos.

#### 2.4.1 Extração em fase sólida

Um processo amplamente utilizado para a concentração de amostras analisadas pelo método do Teste de Ames é a extração em fase sólida (ALEEM; MALIK, 2005; GRABOW et al., 1981; KUTLU et al., 2007; LIU et al., 2007; SUJBERT et al., 2006; UMBUZEIRO et al., 2004).

Extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Extration* (SPE) é uma técnica de separação líquido-sólido que resulta na extração de analitos de interesse de uma amostra. Emprega-se uma coluna aberta contendo a fase sólida (também denominada cartucho) pela qual a amostra (fase líquida) permeia. Os analitos ficam retidos na coluna e são eluídos posteriormente com um pequeno volume de solvente (LANÇAS, 2004).

A extração em fase sólida pode ser realizada de algumas maneiras diferentes, dependendo do objetivo da extração. Segundo Lanças (2004), dentre os principais modos de operação destacam-se a concentração de analitos, o isolamento de analito (*clean-up*) e o isolamento da matriz.

O método de concentração de analitos consiste em utilizar volumes grandes de amostra de modo que o solvente e os interferentes passam pela fase sólida e os analitos de interesse ficam retidos. Posteriormente elui-se os analitos aprisionados no cartucho com pequena quantidade de solvente de maneira que o analito coletado esteja bem mais concentrado que na amostra ambiental.

No método de isolamento de analito, também denominada *clean-up*, o objetivo é isolar o analito de interesse dos interferentes da matriz. Neste caso o objetivo não é concentrar a amostra, e sim eliminar os compostos de uma matriz potencialmente complexa, isolando o analito de interesse.

O método de isolamento da matriz consiste em reter na fase sólida os compostos da matriz, em vez do analito de interesse. Desta maneira o analito é coletado em um frasco e o cartucho contendo os interferentes da matriz é descartado.

Os materiais geralmente utilizados em SPE são sílica gel, alumina, silicato de magnésio, carvão ativado, polímeros e sílica quimicamente ligada. A escolha do material apropriado para a fase sólida depende da natureza do analito de interesse e da matriz na qual ele se encontra. Os cartuchos que utilizam fase sólida polimérica geralmente têm a vantagem (sobre as de sílica) de poderem ser utilizadas em ampla faixa de pH (LANÇAS, 2004).

#### 2.4.2 Mecanismos de separação

Os mecanismos utilizados em SPE são adsorção, partição, troca iônica e exclusão por tamanho.

Os adsorbentes mais comuns utilizados para adsorção são a sílica, a alumina e o Florisil<sup>®</sup>, que é um silicato de magnésio (PAWLISZYN, 2002). A sílica é o adsorbente mais utilizado, possui uma superfície ligeiramente ácida que retém compostos básicos. A alumina apresenta superfície básica, retendo compostos ácidos e o Florisil<sup>®</sup> é geralmente utilizado na adsorção de pesticidas (LANÇAS, 2004).

Grande área superficial e alta atividade são propriedades que aumentam a retenção dos analitos pelos adsorbentes. Por outro lado as propriedades dos analitos que influenciam no grau de retenção dependem do número e tipo de grupos funcionais presentes nos mesmos (PAWLISZYN, 2002).

De maneira geral a adsorção é utilizada para o isolamento de analitos de baixa e média polaridade de soluções não aquosas, para o isolamento de cátions e ânions de soluções aquosas tamponadas e simplificação de matriz por fracionamento em grupos contendo tipos e quantidades similares de grupos funcionais (PAWLISZYN, 2002).

Frequentemente as fases estacionárias utilizadas na adsorção apresentam o problema de adsorção irreversível a compostos altamente polares, por esse motivo foram desenvolvidos materiais sintéticos que apresentam o mecanismo da partição (LANÇAS, 2004) chamados de sorbentes de baixa especificidade (PAWLISZYN, 2002).

Os sorbentes de baixa especificidade são amplamente utilizados para o isolamento de contaminantes na água (PAWLISZYN, 2002). No mecanismo da partição, as fases sólidas empregadas são preparadas a partir da sílica utilizada nos processos de adsorção, sendo adicionado à sua estrutura básica um radical alquílico ou grupo funcional (LANÇAS, 2004). Estes sorbentes podem ser elaborados com uma vasta gama de densidade de ligações, tamanho de poros e tipos de grupos funcionais (PAWLISZYN, 2002).

Os grupos silanóis na fase estacionária que permanecem sem estarem ligados a um grupo funcional podem ser fontes de adsorção e criar uma superfície heterogênea no material. Para a eliminação destes grupos pode ser utilizado o trimetilclorosilano para que ocorra uma reação de finalização denominada “endcapping” (LANÇAS, 2004).

Neste mecanismo utiliza-se o termo fase normal quando a fase sólida é mais polar que a fase líquida, e, de maneira análoga, denomina-se fase reversa a partição na qual a fase sólida é menos polar que a fase líquida. O grupo funcional adicionado à sílica é que define se a fase será normal ou reversa (LANÇAS, 2004).

O mecanismo de troca iônica é utilizado para o isolamento de analitos de caráter ácido ou básico presentes em soluções aquosas. Os principais fatores que influenciam a separação por este método são: pH, seletividade do contra-íon, força iônica solvente e fluxo (LANÇAS, 2004).

No mecanismo de exclusão por tamanho, a fase sólida utilizada é geralmente um polímero cujo tamanho dos poros determina quais compostos serão retidos e quais serão eluídos através do cartucho (LANÇAS, 2004).

### 2.4.3 XAD4 e C<sub>18</sub>

A resina denominada C<sub>18</sub> utiliza o método de partição e apresenta estrutura de sílica gel onde está ligado o radical octadecilsilano. Trata-se de um sorbente não polar, de fase reversa, sem finalização (*non endcapped*) que, por isso, confere interações polares adicionais associadas com os grupos silanóis. Recomenda-se tal resina para extração em fase sólida para propósitos gerais, de analitos polares e apolares (AGILENT TECHNOLOGIES, 2010).

Esta resina mostrou-se eficiente na recuperação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de água superficial (LIMA, 2008) e pesticidas (FARIA, 2004), além de amins aromáticas heterocíclicas em amostras de carne (RICHLING et al., 1998).

Por outro lado, a resina XAD4 é um produto não iônico, polimérico, sendo composto de estireno-divinilbenzeno. Esta resina é utilizada para a extração de fenol, compostos fenólicos e aromáticos e ainda compostos orgânicos e organoclorados, herbicidas e pesticidas.

Nascimento Filho et al. (2001) utilizaram esta resina para extração de amostras de chorume e posterior cromatografia de íon total, identificando diversas classes de compostos, entre eles ácidos carboxílicos, alcoóis, compostos nitrogenados e cetonas.

Pereira et al. (2007), Valente-Campos (2009) entre outros autores identificaram compostos mutagênicos mediante aplicação do Teste de Ames em amostras concentradas com a utilização da resina XAD 4.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Amostragem

A amostra do efluente foi coletada após os tratamentos físico-químico e biológico da estação de tratamento de efluentes da refinaria de petróleo REPLAN, localizada no município de Paulínia, Estado de São Paulo, no ponto de descarte para o rio Atibaia.

A coleta foi realizada no mês de julho do ano de 2010 e armazenada em recipientes devidamente identificados e mantidos em balde de isopor com gelo para o transporte até o laboratório, onde permaneceram refrigerados a 4°C até o momento da extração em fase sólida.

A amostra apresentava as seguintes características gerais físicas e químicas: pH 8,35; temperatura 27,88°C; condutividade 1547,13 $\mu$ S/cm e óleos e graxas 1,08mg/L.

### 3.2 Extração

#### 3.2.1 Resina XAD4

Para o preparo da resina, a mesma foi lavada com água destilada várias vezes de maneira que impurezas inorgânicas tais como cloreto de sódio e o carbonato de sódio presentes na mesma fossem eliminados. O condicionamento da resina foi realizado utilizando-se 5mL de metanol e 20 mL de diclorometano (DCM).

Após o preparo da resina, uma amostra de 20 litros do efluente foi eluída através da resina Amberlite<sup>®</sup> XAD4 (Spectrum Chemical), tendo sido utilizado 1mL de resina por litro

de amostra. Após a eluição da amostra de efluente, descartou-se o eluato (água e substâncias não adsorvidas pela resina).

A extração dos compostos de interesse foi realizada utilizando-se 5mL de metanol e 20mL de diclorometano (DCM). Para a secagem do extrato, preparou-se uma coluna de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro por onde eluiu-se 10mL de diclorometano, o extrato e mais 2mL adicionais de diclorometano.

Os solventes foram evaporados sob fluxo de nitrogênio e em seguida o extrato foi ressuspensão em 20mL de dimetilsulfóxido (DMSO).

A ressuspensão foi esterilizada em membrana e posteriormente diluída em DMSO esterilizado nas mesmas condições de maneira a obter-se concentrações apropriadas para o teste das doses de 500; 400; 300; 200 e 100 mL equivalentes de efluente por placa.

### 3.2.2 Resina $\text{C}_{18}$

O preparo da resina foi realizado conforme Innocentini (2006). Os cartuchos foram lavados inicialmente com 4 porções de 10mL de diclorometano e 4 porções de 10mL de metanol, de maneira que entre uma porção e outra não foi permitido que a resina secasse.

Adicionou-se uma porção de 10mL de água desionizada, deixou-se secar o cartucho e adicionou-se nova porção de 10mL de água desionizada de maneira que a fase estacionária ficasse coberta com uma camada de cerca de 1mm de água. O orifício dos cartuchos foi bloqueado para evitar que a resina secasse até a realização da extração das amostras.

Após o preparo da resina, uma amostra de 20 litros do efluente foi eluída através de cartuchos de resina  $\text{C}_{18}$  Accubond II ODS (Agilent Technologies), tendo sido utilizado 1mL de resina por litro de amostra. Após a eluição da amostra de efluente, descartou-se o eluato (água e substâncias não adsorvidas pela resina), lavou-se o cartucho com 10mL de água mili-Q secando-se o cartucho por 10 minutos.

A extração dos compostos de interesse retidos na resina foi realizada com a eluição de 3 porções de 5mL de diclorometano através de cada cartucho. Para a secagem do extrato, fez-se uma coluna de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro por onde passou-se 10mL de diclorometano, o extrato e mais 2mL adicionais de diclorometano.

Os solventes foram evaporados sob fluxo de nitrogênio e em seguida o extrato foi ressuspensão em 20mL de DMSO. A ressuspensão foi esterilizada em membrana e posteriormente diluída em DMSO estéril de maneira a obter-se concentrações apropriadas para o teste das doses de 500; 400; 300; 200 e 100 mL equivalentes de efluente por placa.

A eluição foi realizada utilizando-se 5mL de etil acetato e 5mL de diclorometano. Os solventes foram evaporados sob fluxo de nitrogênio e em seguida ressuspenso em 8mL de DMSO.

A ressusensão foi filtrada em membrana com poros de 0,22µm de diâmetro para eliminar microrganismos presentes, e posteriormente diluída em DMSO esterilizado de maneira a obter-se concentrações apropriadas para o teste das doses de 150; 100; 75; 50 e 25 ml equivalentes por placa.

### 3.3 Teste de Ames

#### 3.3.1 Microrganismo indicador

Foram utilizadas no teste as linhagens mutantes TA 98 e TA 100 de *S. typhimurium* como organismo indicador da presença de compostos mutagênicos nas amostras analisadas. As características das cepas utilizadas são apresentadas na Tabela 02.

**Tabela 02: Características das cepas de *S. typhimurium* utilizadas no ensaio**

Cepa	Alvo da mutação	Genótipo	Tipo de mutágeno detectado
TA 98	CG	his D3052, rfa, Δ uvrB, bio <sup>-</sup> , pKM101 (Ap <sup>R</sup> )	Causadores de deslocamento do quadro de leitura do DNA
TA 100	CG	his G46, rfa, Δ uvrB, bio <sup>-</sup> , pKM101 (Ap <sup>R</sup> )	Causadores de substituição de pares de base no DNA

Fonte: Modificado de Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1994.

#### 3.3.2 Verificação – Provas genéticas

Antes do início dos ensaios, foram realizados testes para a verificação das características genéticas das cepas de *S. typhimurium* a serem utilizadas. As cepas foram testadas quanto à dependência de histidina, mutação rfa, presença de deleção uvrB e presença do plasmídeo pKM101, conforme descrito abaixo.

##### Dependência de histidina

Foi testado o caráter de dependência de histidina nas linhagens de *S. typhimurium* T98 e T100 utilizadas no teste semeando-se a cultura crescida em caldo em duas placas de petri previamente preparadas com meios de composição diferente: (i) ágar mínimo com biotina e

(ii) ágar mínimo com biotina e histidina. As placas foram incubadas invertidas por 24 horas a 37°C.

A dependência de histidina é confirmada pelo crescimento bacteriano apenas em placas contendo meio com este aminoácido. Nas placas cujo meio não contém histidina, as linhagens com a mutação não apresentam crescimento.

#### **Presença de mutação rfa**

A mutação rfa gera maior permeabilidade da célula a moléculas grandes devido a modificações na camada lipopolissacarídica da membrana celular bacteriana.

A presença desta mutação nas cepas de *S. typhimurium* utilizadas foi testada por meio da sensibilidade das mesmas ao cristal violeta.

No centro de placas contendo ágar nutriente, previamente semeadas com as culturas bacterianas, foi colocado um disco de papel de antibiose embebido em cristal violeta. As placas foram incubadas invertidas por 24 horas a 37°C.

As linhagens com a mutação rfa apresentam halo de inibição ao redor do disco.

#### **Presença da deleção uvrB**

Placas de ágar nutriente semeadas com as culturas bacterianas foram cobertas pela metade com papel alumínio e irradiadas por oito segundos com lâmpada germicida, sendo incubadas posteriormente por 24h a 37°C.

A presença da deleção uvrB é confirmada nas linhagens que crescerem apenas do lado da placa que não foi irradiado.

#### **Presença do plasmídeo pKM101**

As culturas bacterianas foram inoculadas em placas de petri com ágar nutriente de forma perpendicular às estrias de solução de ampicilina previamente aplicadas no mesmo. As placas foram incubadas invertidas por 24 horas a 27°C.

As linhagens que contiverem o plasmídeo pKM101 são identificadas pois apresentam crescimento normal mesmo sobre a linha onde foi aplicado o antibiótico

### **3.3.3 Taxa de reversão espontânea**

Cada cepa de *S. typhimurium* apresenta uma taxa característica de reversão espontânea de auxotróficas para prototróficas em relação ao aminoácido histidina.

Para a verificação da taxa de reversão espontânea das linhagens utilizadas, inoculou-se 100 µL de cada cultura em 2,0 mL de ágar de superfície fundido, homogeneizou-se o tubo e em seguida verteu-se o conteúdo do mesmo em placa contendo ágar mínimo.

O teste foi realizado em triplicata, sendo que a taxa de reversão espontânea foi avaliada após 66 horas de incubação a 37°C. A taxa de reversão esperada para cada linhagem, de acordo com NORMA CETESB é de 25 a 75 para TA 98 e de 75 a 225 para TA 100.

### 3.3.4 Teste de viabilidade

Uma vez que as culturas de bactérias utilizadas no ensaio devem apresentar número de células por mililitro na faixa de 1 a  $2 \times 10^9$ , foi realizado o teste de viabilidade para a verificação da concentração das mesmas.

Para a realização deste teste, diluiu-se a cultura de bactérias até  $1 \times 10^{-6}$  e inoculou-se 0,1 mL em placa de Petri contendo ágar nutriente, espalhando-se esta alíquota sobre o meio com auxílio de uma alça de Drigalsky. Após a incubação por 24 horas a 37°C as colônias foram contadas. Este teste foi realizado com ambas as linhagens de *S. typhimurium*, em duplicata.

### 3.3.5 Procedimento do ensaio

O método de ensaio utilizado para a realização do Teste de Ames foi o Método Direto com pré-incubação com e sem sistema de ativação metabólica.

Para obtenção das culturas de *S. typhimurium* para a realização do teste, inoculou-se 0,1 mL das culturas provenientes de ampolas de uso rotineiro armazenadas sob refrigeração em 20 mL de caldo nutriente e incubou-se por 18 horas a 37°C sob agitação.

Para o ensaio sem ativação metabólica, foram adicionados em tubos de ensaio a amostra de água, 0,1 mL de cultura de *S. typhimurium* previamente crescida e 0,5 mL de tampão fosfato 0,2 M. No caso do ensaio com ativação metabólica, ao invés do tampão, adicionou-se 0,5 mL da fração S9.

Os controles negativos e positivos foram realizados da mesma maneira, sendo que para os negativos a amostra de água foi substituída por 100 µL de DMSO e para os positivos foi substituída por 10 µL de substâncias padrão, conforme Tabela 03.

**Tabela 03: Substâncias padrão utilizadas para realização dos controles positivos**

Ensaio	Composto	Solvente	Concentração por placa	Cepa
Sem ativação metabólica	4-nitroquinolina 1-óxido	DMSO	0,5 µg	TA 98
	Azida sódica	Água destilada	5,0 µg	TA 100
Com ativação metabólica	2-aminoantraceno	DMSO	2,5 µg	TA 98 e TA 100

Fonte: Modificado de Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1994.

Homogeneizou-se os tubos em vortex de baixa velocidade e os mesmos foram incubados por 30 minutos a 37°C sem agitação.

Após o período de incubação, adicionou-se o ágar de superfície, homogeneizou-se os tubos e o conteúdo dos mesmos foi vertido em placas de Petri contendo 20 mL de ágar mínimo que foram incubadas por 66 horas a 37°C. O teste foi realizado em triplicata com cinco concentrações de amostra de água diferentes. Os controles positivos foram realizados em duplicata e os negativos em quintuplicata.

As quantidades de ágar de superfície e de amostra inseridas nos tubos de ensaio estão descritas na Tabela 04.

**Tabela 04: Concentração de ágar de superfície e volume de amostra utilizados no ensaio**

Concentração do ágar de superfície	Volume de ágar de superfície por tubo (mL)	Volume de amostra de água por tubo (mL)
1,0 x	3,0	0,1
1,5 x	2,5	0,5
2,0 x	2,0	1,0
2,5 x	1,5	1,5
3,0 x	1,0	2,0

Fonte: Modificado de COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 1994.

Após o período de incubação, as colônias foram contadas e os resultados foram analisados estatisticamente como descrito no item a seguir.

### 3.3.6 Análise e interpretação dos resultados

Os dados obtidos da contagem de colônias revertentes nas placas foram inseridos no programa computacional Salanal para a realização de análises de variância (ANOVA) e ajuste dos dados aos modelos mais adequados.

Considerou-se uma amostra positiva para mutagenicidade quando a razão de mutagenicidade (RM) foi maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas e o efeito dose-resposta foi verificado.

A razão de mutagenicidade foi calculada dividindo-se a média do número de revertentes na placa teste (espontâneos e induzidos) pela média do número de revertentes por placa do controle negativo (espontâneos).

A existência do efeito dose-resposta é verificada quando os dados se enquadram em um dos três modelos utilizados pelo programa: linear simples, linear atenuado por toxicidade exponencial simples e linear atenuado por toxicidade exponencial a segunda potência.

Quando nenhum destes modelos adapta-se aos dados, o programa seleciona apenas algumas doses a serem testadas, de modo que os dados sejam condizentes com o modelo linear. Esta variação é chamada truncagem tipo Bernstein e os resultados obtidos devem ser analisados com cautela.

Os resultados são fornecidos pelo programa em termos de probabilidade, sendo:

- Análise de variância – Teste F (ANOVA): valores de P menores ou iguais a 5% indicam que há diferença significativa entre os resultados obtidos das diferentes doses testadas;
- Modelo mais aceitável: quanto maior o valor de p, mais ajustados estão os dados em relação ao modelo;
- Dose resposta: Valores de P iguais ou menores que 5% indicam positividade na dose-resposta.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Provas genéticas

Observou-se que ambas as cepas testadas (TA98 e TA100), após período de incubação, cresceram em meio contendo histidina e não cresceram em meio que não continha este aminoácido

Nas placas onde foram utilizados discos com cristal violeta, após período de incubação foi constatado halo de inibição de crescimento bacteriano com diâmetro de 15 mm na placa semeada com a linhagem TA98 e 19 mm para a TA100.

Além disso, ambas as cepas testadas cresceram apenas na metade da placa não irradiada por luz UV e não apresentaram inibição no local onde foi aplicado antibiótico.

Os resultados das provas genéticas estão resumidos na Tabela 05, apresentada a seguir.

**Tabela 05: Resultados das provas genéticas.**

Concentração (mL eq/placa)	TA100	TA 98
Meio com histidina	Crescimento	Crescimento
Meio sem histidina	Ausência de crescimento	Ausência de crescimento
Lado irradiado por luz UV	Ausência de crescimento	Ausência de crescimento
Lado não irradiado por luz UV	Crescimento	Crescimento
Local de aplicação de antibiótico	Crescimento	Crescimento
Local sem aplicação de antibiótico	Crescimento	Crescimento
Disco contendo Cristal Violeta	Halo de inibição de 19mm de diâmetro	Halo de inibição de 15mm de diâmetro

Analisando-se os resultados obtidos nas provas genéticas, tem-se que a bactéria utilizada nos ensaios apresentava as características necessárias ao mesmo, ou seja, caráter auxotrófico para histidina, mutação rfa, mutação uvrB e plasmídeo pKM101.

## 4.2 Taxa de reversão espontânea

Na Tabela 06 são apresentados os resultados para a prova de reversão espontânea, assim como a taxa indicada pela norma L5.621 (CETESB, 1994).

Pode-se observar que as cepas utilizadas apresentaram número de colônias revertentes dentro do intervalo indicado pela norma.

**Tabela 06: Análise da taxa de reversão espontânea.**

Cepa	Taxa de reversão espontânea (número de colônias/por placa)			Taxa indicada (CETESB, 1994)
TA100	127	147	91	75-225
TA98	26	27	26	25-75

## 4.3 Teste de viabilidade

A viabilidade de cultura pernoite resultou acima do indicado pela norma L5.621 (CETESB, 1994), como pode ser observado na Tabela 07.

**Tabela 07: Análise dos resultados do teste de viabilidade.**

Cepa	Teste de viabilidade (número de colônias/por placa)		Taxa indicada (CETESB, 1994)
TA100	255	253	100-200
TA98	262	279	100-200

## 4.4 Ensaio

### 4.4.1 Considerações gerais

Conforme pode ser observado nas Tabelas 08 a 14, o controle negativo realizado concomitantemente ao Teste de Ames representa a taxa de reversão espontânea da bactéria

nas condições do ensaio. Os resultados obtidos deste controle demonstram que a bactéria, mesmo não exposta a substâncias mutagênicas, apresentou reversão.

Em contrapartida, muitas placas do ensaio nas quais foram aplicadas diferentes doses de efluente não apresentaram nenhum crescimento. Uma vez que a bactéria apresentou reversão espontânea no controle negativo, tem-se que nas placas que não apresentaram crescimento a bactéria não sobreviveu.

Isso pode ter ocorrido no período de pré-incubação devido à alta concentração de substâncias tóxicas presentes nas amostras testadas. Uma vez que o efluente é uma amostra complexa, não é possível determinar qual substância causou a morte das bactérias.

Assim, os testes estatísticos foram realizados ignorando-se os resultados iguais a zero, pois tais resultados não representam que não houve reversão, mas sim que a bactéria morreu.

Este fato comprometeu os resultados do presente trabalho, uma vez que o ensaio com a amostra concentrada pela resina XAD4 com ambas as cepas com presença de S9 não apresentaram crescimento em nenhuma placa, inviabilizando a comparação entre os resultados das duas resinas.

Além disso, devido ao desvio padrão muito elevado e ausência de dose-resposta em alguns tratamentos, pode-se inferir que mesmo nas placas onde ocorreu o crescimento parte das bactérias pode ter morrido em decorrência da toxicidade da amostra, comprometendo os resultados.

**Tabela 08: Avaliação mutagênica de efluente realizada com linhagem TA98 na ausência de ativação metabólica (S9) – extração por resina C<sub>18</sub>.**

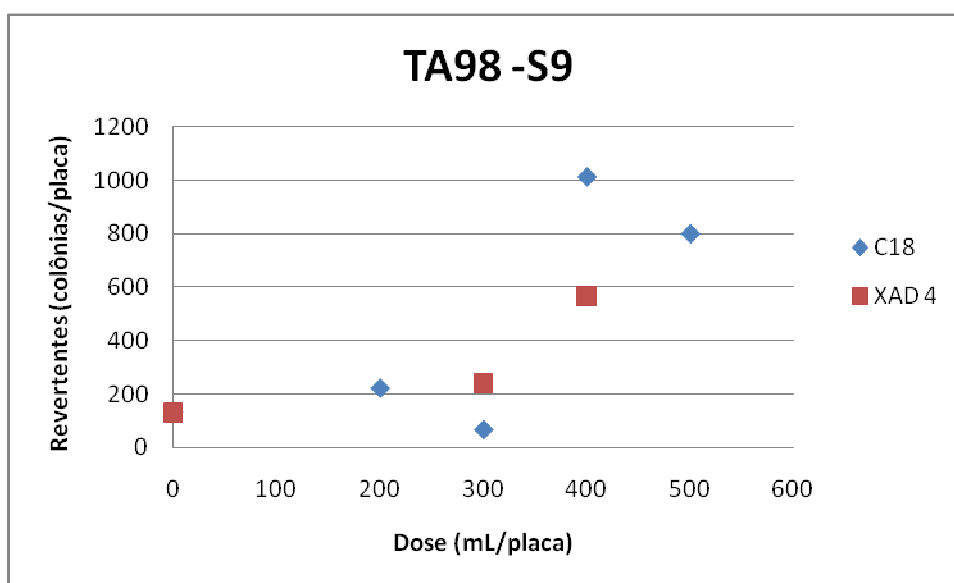
Concentração (mL eq/placa)	TA98 -S9 (número de colônias/placa)					Média	Mediana	Desvio padrão	RM
	115	110	167	176	89				
<b>0</b>	115	110	167	176	89	131,40	115	38,02	-
<b>100</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>200</b>	222	-	-	-	-	222,00	222,00	-	1,69
<b>300</b>	50	50	100	100	100	66,67	50,00	28,87	0,51
<b>400</b>	1080	1120	840	840	840	1013,33	1080,00	151,44	7,71
<b>500</b>	800	800	800	800	800	800,00	800,00	-	6,09
<b>Valor de P para dose resposta</b>								0,995	
<b>Valor de P para ANOVA</b>								< 0,001	
<b>Modelo aceitável (p)</b>								Bernstein (0,165)	
<b>Revertentes/mL</b>								-0,213	
<b>Limite de confiança</b>								< -0,334; -0,092>	

Como pode ser observado nas Tabelas 08 e 09 e na Figura 01, referentes à cepa TA98 sem a utilização de S9, o valor de P para dose resposta da amostra concentrada pela resina C<sub>18</sub>, é maior que 0,05 indicando resultado negativo para este parâmetro. Já o valor de P para a amostra concentrada com a resina de XAD4 resultou menor que 0,05, podendo-se considerar positiva a relação dose-resposta neste caso.

Para as amostras concentradas com ambas as resinas o valor de P para ANOVA indica que há diferença significativa entre os resultados das diferentes doses testadas.

**Tabela 09: Avaliação mutagênica de efluente realizada com linhagem TA98 na ausência de ativação metabólica (S9) – extração por resina XAD4.**

Concentração (mL eq/placa)	TA98 -S9 (número de colônias/placa)					Média	Mediana	Desvio padrão	RM
	115	110	167	176	89				
0	115	110	167	176	89	131,40	115,00	38,02	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
300	-	-	240	240	-	240,00	240,00	-	1,83
400	-	-	864	268	-	566,00	566,00	421,44	4,31
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Valor de P para dose resposta</b>								0,016	
<b>Valor de P para ANOVA</b>								0,046	
<b>Modelo aceitável (p)</b>								Linear (0,137)	
<b>Revertentes/mL</b>								0,609	
<b>Limite de confiança</b>								< 0,187; 1,032 >	



**Figura 01: Avaliação mutagênica de efluente realizada com linhagem TA98 na ausência de ativação metabólica (S9) – Comparação entre resinas C<sub>18</sub> e XAD4.**

**Tabela 10: Avaliação mutagênica de efluente realizada com linhagem TA98 na presença de ativação metabólica (S9) – extração por resina C<sub>18</sub>.**

Concentração (mL eq/placa)	TA98 +S9 (número de colônias/placa)					Média	Mediana	Desvio padrão	RM
	119	134	52	52	151				
<b>0</b>	119	134	52	52	151	101,60	119,00	46,67	-
<b>100</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>200</b>	124	-	-	-	295	209,50	209,50	120,92	2,06
<b>300</b>	-	-	-	-	50	50,00	50,00	-	0,49
<b>400</b>	760	-	-	-	107	433,50	433,50	461,74	4,27
<b>500</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Valor de P para dose resposta</b>								0,5	
<b>Valor de P para ANOVA</b>							0,196 (não significante)		
<b>Modelo aceitável (p)</b>							Linear (0,112)		
<b>Revertentes/mL</b>							0,000		
<b>Limite de confiança</b>							< -0,356; 0,356 >		

As Tabelas 10 e 11 e Figura 02 apresentam os resultados do ensaio realizado com a cepa TA98 na presença de ativação S9 para amostras concentradas com a resina C<sub>18</sub> e XAD4, respectivamente.

Conforme pode ser observado, a amostra da resina C<sub>18</sub> apresentou relação dose-resposta e diferença no número de revertentes nas diferentes doses testadas não significativas (valores P maiores que 0,05).

Já o ensaio realizado nas mesmas condições com a amostra concentrada na resina XAD4 apenas apresentou crescimento nas placas de controle negativo, devido à morte da bactéria nas demais placas. Isso pode indicar uma maior citotoxicidade do eluato obtido da resina XAD4 em comparação com o obtido da resina C<sub>18</sub>.

Tabela 11: Avaliação mutagênica de efluente realizada com linhagem TA98 na presença de ativação metabólica (S9) – extração por resina XAD4.

Concentração (mL eq/placa)	TA98 +S9 (número de colônias/placa)					Média	Mediana	Desvio padrão	RM
	119	134	52	52	151				
0	119	134	52	52	151	101	119	46	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
300	-	-	-	-	-	-	-	-	-
400	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Valor de P para dose resposta</b>								-	
<b>Valor de P para ANOVA</b>								-	
<b>Modelo aceitável (p)</b>								-	
<b>Revertentes/mL</b>								-	
<b>Limite de confiança</b>								-	

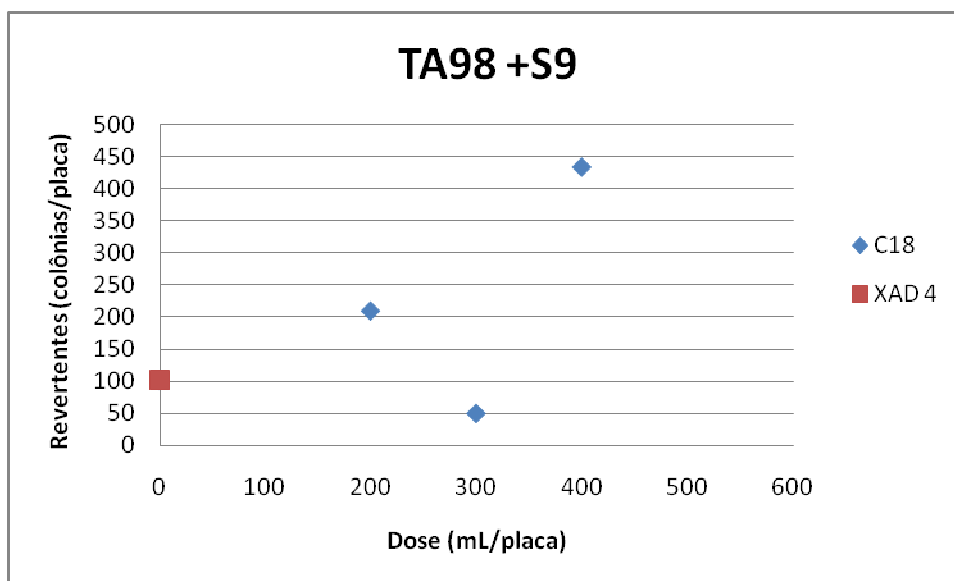


Figura 02: Avaliação mutagênica de efluente realizada com linhagem TA98 na presença de ativação metabólica (S9) – Comparação entre resinas C<sub>18</sub> e XAD4.

**Tabela 12: Avaliação mutagênica de efluente realizada com linhagem TA100 na ausência de ativação metabólica (S9) – extração por resina C<sub>18</sub>.**

Concentração (mL eq/placa)	TA100 -S9 (número de colônias/placa)					Média	Mediana	Desvio padrão	RM
	25	29	22	17	28				
0	25	29	22	17	28	24,20	25,00	4,87	-
100	-	-	360	-	90	225,00	225,00	190,92	9,30
200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
300	-	-	600	-	-	600,00	600,00	-	24,79
400	640	-	400	-	400	480,00	400,00	138,56	19,83
500	2240	-	1080	-	1840	1720,00	1840,00	589,24	71,07
<b>Valor de P para dose resposta</b>							<b>&lt; 0,001</b>		
<b>Valor de P para ANOVA</b>							<b>0,001</b>		
<b>Modelo aceitável (p)</b>							<b>Bernstein (0,536)</b>		
<b>Revertentes/mL</b>							<b>1,309</b>		
<b>Limite de confiança</b>							<b>0,903, 1,714</b>		

Conforme pode ser observado nas Tabelas 11 e 12 e Figura 03, o ensaio realizado com a cepa TA100 na ausência de ativação metabólica com amostras extraídas tanto pela resina C18 quanto pela resina XAD4 apresentaram relação dose-resposta positiva e diferença significativa entre o número de revertentes nas diferentes doses testadas (valor de P menor que 0,05)

**Tabela 13: Avaliação mutagênica de efluente realizada com linhagem TA100 na ausência de ativação metabólica (S9) – extração por resina XAD4.**

Concentração (mL eq/placa)	TA100 -S9 (número de colônias/placa)					Média	Mediana	Desvio padrão	RM
	25	29	22	17	28				
0	25	29	22	17	28	24,20	25,00	4,87	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
300	-	-	-	-	200	200,00	200,00	-	8,26
400	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	300	-	296	-	320	305,33	300,00	12,86	12,62
<b>Valor de P para dose resposta</b>							<b>0,005</b>		
<b>Valor de P para ANOVA</b>							<b>&lt; 0,001</b>		
<b>Modelo aceitável (p)</b>							<b>Linear (0,760)</b>		
<b>Revertentes/mL</b>							<b>0,567</b>		
<b>Limite de confiança</b>							<b>&lt; 0,510; 0,623 &gt;</b>		

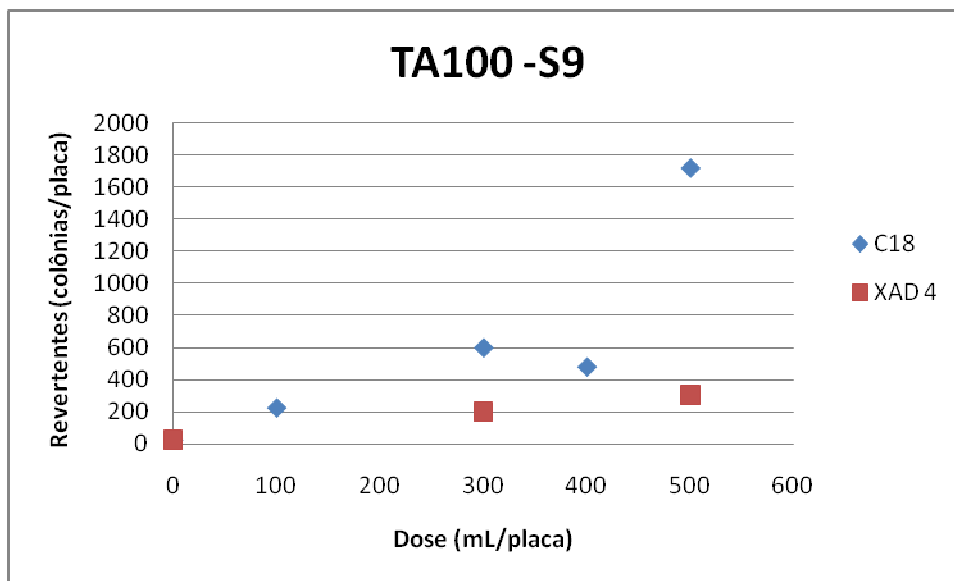


Figura 03: Avaliação mutagênica de efluente realizada com linhagem TA100 na ausência de ativação metabólica (S9) – Comparação entre resinas C<sub>18</sub> e XAD4.

Tabela 14: Avaliação mutagênica de efluente realizada com linhagem TA100 na presença de ativação metabólica (S9) – extração por resina C<sub>18</sub>.

Concentração (mL eq/placa)	TA100 +S9 (número de colônias/placa)					Média	Mediana	Desvio padrão	RM
	32	16	20	40	28				
0	32	16	20	40	28	27,20	28,00	9,55	-
100	-	-	-	-	120	120,00	120,00	-	4,41
200	3213	-	44	-	-	44,00	44,00	-	1,62
300	-	-	-	-	270	270,00	270,00	-	9,93
400	119	-	640	-	352	370,00	352,00	260,98	13,62
500	-	-	210	-	-	210,00	210,00	-	7,72
<b>Valor de P para dose resposta</b>								0,006	
<b>Valor de P para ANOVA</b>								0,052 (não significante)	
<b>Modelo aceitável (p)</b>								Linear (0,173)	
<b>Revertentes/mL</b>								0,397	
<b>Limite de confiança</b>								< 0,177; 0,618 >	

As Tabelas 14 e 15 e Figura 04 apresentam os resultados obtidos com a cepa TA100 na presença de ativação metabólica com amostras concentradas pelas resinas C18 e XAD4 respectivamente.

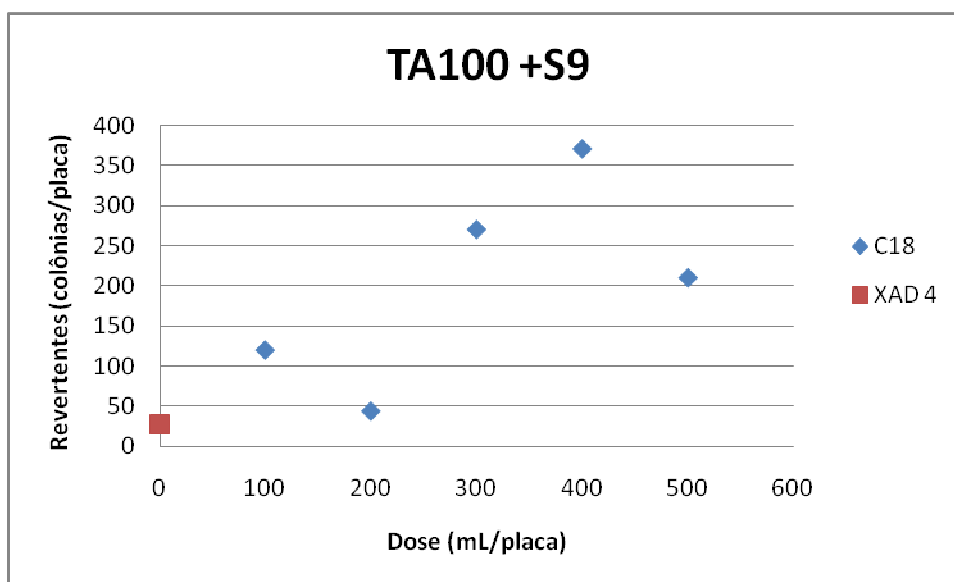
Observa-se relação dose-resposta positiva para o ensaio realizado com amostra concentrada com a resina C18 (valor de P menor que 0,05); e valor de P para ANOVA

ligeiramente acima de 0,05, o que não descarta a significância da diferença entre o número de revertentes nas diferentes doses testadas.

Já nas placas do ensaio realizado com a amostra concentrada com a resina XAD4 não houve crescimento o que indica morte de bactérias e uma maior citotoxicidade do eluato obtido da resina XAD4 em comparação com o obtido da resina C<sub>18</sub>.

**Tabela 15: Avaliação mutagênica de efluente realizada com linhagem TA100 na presença de ativação metabólica (S9) – extração por resina XAD4.**

Concentração (mL eq/placa)	TA100 +S9 (número de colônias/placa)					Média	Mediana	Desvio padrão	RM
	32	16	20	40	28				
0	32	16	20	40	28	27	28	9	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
300	-	-	-	-	-	-	-	-	-
400	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Valor de P para dose resposta</b>								-	
<b>Valor de P para ANOVA</b>								-	
<b>Modelo aceitável (p)</b>								-	
<b>Revertentes/mL</b>								-	
<b>Limite de confiança</b>								-	



**Figura 04: Avaliação mutagênica de efluente realizada com linhagem TA100 na presença de ativação metabólica (S9) – Comparação entre resinas C<sub>18</sub> e XAD4.**

#### 4.4.2 Atividade mutagênica

A amostra testada pode ser considerada mutagênica, uma vez que (a) a razão de mutagenicidade de pelo menos uma dose por tratamento resultou em valor maior que 2; (b) em 3 tratamentos (XAD4 TA98 -S9; XAD4 TA100 -S9 e C18 TA100 -S9) o *p-value* da curva dose resposta e da análise de variância resultaram significativos (menores que 5%).

#### 4.4.3 Efeito do sistema de metabolização (mistura S9)

O maior crescimento nas placas que não receberam o sistema de metabolização S9 pode indicar a inativação total ou parcial de mutágenos pela fração. Isso pode ocorrer enzimaticamente ou por ligações ao acaso entre espécies moleculares dos compostos da amostra e as enzimas microssomais. A diminuição da atividade mutagênica na presença do sistema de metabolização também foi verificada por Valent (1990), Aleem e Malik (2003), Horn (2004).

Além disso, verifica-se uma maior incidência de ausência de crescimento em placas onde foi adicionada a fração S9, o que pode indicar interação entre os compostos do sistema de metabolização e da amostra, gerando efeito citotóxico.

#### 4.4.4 Análise da mutagenicidade através das duas cepas utilizadas

A cepa TA100 é capaz de detectar mutações de substituição de pares de bases no DNA, enquanto a cepa TA98 detecta mutações de deslocamento do quadro de leitura.

Não foi possível determinar qual o tipo de mutágeno prevalente nas amostras analisadas, uma vez que para as amostras eluídas na resina C<sub>18</sub> houve maior número de revertentes da cepa TA100 enquanto para amostras eluídas na resina XAD4 o maior número de revertentes foi da cepa TA98.

Uma vez que as resinas utilizadas adsorvem diferentes tipos de compostos, é possível que a resina XAD4 adsorva diferencialmente mais compostos que causam mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura e a resina C<sub>18</sub> adsorva mais compostos que causam mutações do tipo substituição de pares de bases, porém seriam necessários mais estudos para que esta relação fosse afirmada.

#### 4.4.5 Comparação entre as resinas C<sub>18</sub> e XAD4

As placas que receberam o eluato da resina XAD4 apresentaram maior número de ausência de crescimento em comparação com as placas que receberam eluato da resina C<sub>18</sub>. Isso pode ter ocorrido devido à adsorção diferencial das resinas, sendo a XAD4 mais eficiente para adsorção de compostos mais tóxicos, que causaram a morte das bactérias.

Além disso, nas placas de XAD4 que receberam o fator S9 não houve crescimento algum, o que pode indicar interação entre os compostos adsorvidos por esta resina e o sistema de metabolização de maneira a gerar toxicidade elevada às células bacterianas. Porém, devido ao grande número de placas sem crescimento algum, são necessários novos estudos para a elucidação desta relação.

Conforme já explanado no item anterior, para as amostras eluídas na resina C<sub>18</sub> houve maior número de revertentes da cepa TA100 enquanto para amostras eluídas na resina XAD4 o maior número de revertentes foi da cepa TA98.

Isso pode ser explicado pela adsorção diferencial das resinas utilizadas, sendo possível que a resina XAD4 adsorva diferencialmente mais compostos que causam mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura e a resina C<sub>18</sub> adsorva mais compostos que causam mutações do tipo substituição de pares de bases, porém seriam necessários mais estudos para que esta relação fosse afirmada.

A comparação dos dados obtidos dos ensaios realizados utilizando-se a resina C<sub>18</sub> e a resina XAD4 foi comprometida devido ao grande número de placas com ausência de crescimento. Este fato foi provocado, provavelmente, pelas altas concentrações de amostra utilizadas, o que pode ter gerado um efeito citotóxico muito potente e, conseqüentemente, morte das bactérias. Para obtenção de dados mais acurados é necessário que o experimento seja repetido com doses menores de amostra.

#### 4.5 Controles positivos

Na Tabela 16 são apresentados os resultados obtidos dos controles positivos.

**Tabela 16: Resultados do controle positivo.**

Cepa	Ativação metabólica	Revertentes (número de colônias/placa)	
TA98	-S9	0	0
TA98	+S9	41	22
TA100	-S9	1080	880
TA100	+S9	478	260

Como pode ser observado, nas placas de controle da cepa TA98 sem o sistema de metabolização S9 não houve crescimento. Uma vez que as taxas de reversão espontânea da bactéria estavam dentro dos limites esperados, pode-se inferir que houve morte da bactéria. Além disso, o controle da cepa TA98 realizado sem o sistema de metabolização S9 apresentou baixo crescimento em comparação com os controles negativos de iguais condições. Desta maneira é possível que a bactéria desta cepa estivesse apresentando alguma característica que impediu a mutação reversa e que ocasionou a morte das mesmas.

Os controles positivos da cepa TA100 resultaram em dados que certificam que a bactéria apresentou mutação reversa.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que as doses de amostra utilizadas (100; 200; 300; 400 e 500 mL/placa) geraram um efeito citotóxico que comprometeu a análise adequada dos dados.

Não obstante os dados faltantes foi possível observar as seguintes diferenças entre os testes realizados com as resinas C<sub>18</sub> e XAD4:

- Toxicidade: Maior toxicidade do eluato obtido da resina XAD4;
- Interação com a fração S9: Maior potencialização do efeito citotóxico do eluato da resina XAD4 quando em presença da fração S9;
- Tipo de mutação prevalente detectada: Deslocamento do quadro de leitura para resina XAD4 e substituição de pares de bases, para resina C<sub>18</sub>.

Devido à alta mortalidade das bactérias e ausência de dados suficientes para algumas análises estatísticas, são necessários novos ensaios, utilizando-se doses menores de amostra, para a confirmação dos dados obtidos neste trabalho.

## 6 ETAPAS A SEREM CONCLUÍDAS

A realização de novo ensaio não foi possível até o prazo final de entrega do presente trabalho uma vez que a resina  $C_{18}$  necessária para a realização dos novos testes não estava disponível nos fornecedores nacionais. Por este motivo houve a necessidade de encomenda da resina de fornecedor localizado fora do Brasil, sendo que a entrega da mesma não foi realizada em tempo hábil para a realização do novo ensaio.

Devido ao motivo apresentado, as etapas que serão concluídas posteriormente à entrega do presente trabalho são: (a) realização de novo ensaio com a utilização de concentrações menores de amostra; (b) publicação dos resultados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARDEMA, M. J.; ROBISON, S. H.; GATEHOUSE, D.; JOHNSTON G. An evaluation of the genotoxicity of the antitussive drug Dextromethorphan. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 50, p. 285–293, 2008.

AGILENT TECHNOLOGIES. **AccuBond II SPE Cartridges**. Disponível em <<http://www.chem.agilent.com/en-us/products/consumables/samplepreparation/accubondiireversedphase/pages/default.aspx>>. Acesso em 15 abr. 2010.

ALEEM, A.; MALIK, A. Genotoxic hazards of long-term application of wastewater on agricultural soil. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 538, p.145-154, 2003.

ALEEM, A.; MALIK, A. Genotoxicity of the Yamuna River water at Okhla (Delhi), India. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, Amsterdam, v. 61, p.404-412, 2005.

AMES, B. N.; DURSTON, W. E.; YAMASAKI, E.; LEE, F. D. Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 8, p. 2281-2285, 1973 a.

AMES, B. N.; LEE, F. D.; DURSTON, W. E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 3, p.782-786, 1973 b.

ANSARI, M. I.; MALIK, A. Genotoxicity of agricultural soils in the vicinity of industrial area. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 673, p. 124–132, 2009.

AZEVEDO, F. A. de; CHASIN, A. A. M. (Org.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Paulo: Intertox, 2004. 340p.

BRUSICK, D. J. **Principles of genetic toxicology**. 2. ed. Nova York: Plenum, 1980. 262p.

BRUSICK, D. J. A perspective on testing of existing pharmaceutical excipients for genotoxic impurities. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 55, p. 200–204, 2009.

CLAXTON, L. D.; UMBUZEIRO, G. A.; DEMARINI, D. M. **The *Salmonella* mutagenicity assay:** The stethoscope of genetic toxicology for the 21st century. Disponível em: < <http://ehp03.niehs.nih.gov/home.action>>. Acesso em: 17 set. 2010.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Norma CETESB L5.621:** mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* – teste de Ames – método direto – método de ensaio. São Paulo, 1994.

FARIA, L. J. S. **Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água.** 2004. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

FATIMA, R. A.; AHMAD; M. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: A comparison of three bioassays. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 609, p. 81–91, 2006.

GOMES-CARNEIRO, M. R.; RIBEIRO-PINTO, L. F.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, n. 13, p.27-38, 1997.

GRABOW, W. O. K.; BURGER, J. S.; HILNER, C. A. Comparison of Liquid-Liquid Extraction and Resin Adsorption for concentrating Mutagens in Ames *Salmonella*/Microsome Assays on Water. **Bulletin of Environmental Contamination And Toxicology**, v. 27, p.442-449, 1981.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROL, S. B. **Introdução à genética.** 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 712p.

GUPTA, P.; MATHUR, N.; BHATNAGAR, P.; NAGAR, P.; SRIVASTAVA, S. Genotoxicity evaluation of hospital wastewaters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1925–1932, 2009.

GUZZELLA, L.; MONARCA; S.; ZANI, C.; FERETTI, D.; ZERBINI, I. BUSCHINI, A.; POLI, P.; ROSSI, C.; RICHARDSON, S. D. In vitro Potential genotoxic effects of surface drinking water treated with chlorine and alternative disinfectants. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 564, p. 179–193, 2004.

HORN, R. C.; ROCHA, J. A. V.; VARGAS, V. M. F. Determination of sediment mutagenicity and cytotoxicity in an area subjected to petrochemical contamination. **Mutagenesis**, v. 19, n. 6, p. 445-451, 2004.

HUANG, W. J.; CHANG, C. Y.; SHIH, F. H. Disinfection by-product formation and mutagenic assay caused by preozonation of groundwater containing bromide. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 158, p. 181–196, 2009.

ILA, H. B.; TOPAKTAS, M.; RENCUZOGULLARI, E.; KAYRALDIZ, A.; DONBAK, L.; DAGLIOGLU, Y. K. Genotoxic potential of cyfluthrin. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 656, p. 49–54, 2008.

INNOCENTINI, A. P. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em água para consumo humano na cidade de Araraquara-SP.** 2006. 82 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

KING, L. C.; HESTER, S. D.; WARREN, S. H.; DEMARINI, D. M. Induction of abasic sites by the drinking-water mutagen MX in *Salmonella* TA100. **Chemico-Biological Interactions**, v. 180, p. 340–343, 2009.

KUMMROW, F.; MAGALHÃES, D.; FRANCO, A.; UMBUZEIRO, G. A. Blue rayon e teste *Salmonella*/microsoma na avaliação da qualidade de águas costeiras. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 5, p.890-897, 2006.

KUMMROW, F.; UMBUZEIRO, G. A. Uso do blue rayon para extração/concentração de compostos policíclicos em amostras ambientais. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 528-534, 2006.

KUTLU, M.; AYDOĞAN, G.; MUMCU, E. Mutagenicity analysis of water samples from Seydisuyu (Kırka, Turkey) stream under the influence of boron production complex. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2064-2068, 2007.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE).** São Carlos: Rima, 2004. 93p.

LARINI, L. **Toxicologia.** 3. ed. São Paulo: Manole Ltda, 1997. 301p.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Avaliação da qualidade de águas impactadas por petróleo por meio de sistemas-teste biológico (*Allium cepa*) - um estudo de caso. In: **4 Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás**, 2007, Campinas-SP. Anais do 4 Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 2007.

LIMA, A. C. **Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em águas superficiais nos rios Piracicaba e Doce, Ipatinga-MG, utilizando a técnica de EFS-CLAE-DAD.** 2008. 84 f. Dissertação (Mestre) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.

LIU, J. R.; PANG, Y. X.; TANG, X. L.; DONG, H. W.; CHEN, B. Q.; SUN, C. H. Genotoxic activity of organic contamination of the Songhua River in the north-eastern region of the People's Republic of China. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 634, p. 81-92, 2007.

LOH, D. S. Y.; ER, H. M.; CHEN Y. S. Mutagenic and antimutagenic activities of aqueous and methanol extracts of *Euphorbia hirta*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 406–414, 2009.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock.** 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p.

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

MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do BTEX, utilizando o sistema teste de *Allium cepa*.. In: **3 Workshop de Ecotoxicologia**, 2008, Rio Claro. Suplemento especial on line da Revista Holos. Rio Claro : Centro de Estudos Ambientais, 2008. v. 8.

MONARCA, S.; FERETTI, D.; COLLIVIGNARELLI, C.; GUZZELLA, L.; ZERBINI, I.; BERTANZA, G.; PEDRAZZANI, R. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. **Water Research**, v. 34, n. 17, p. 4261-4269, 2000.

NASCIMENTO FILHO, I.; MÜHLEN, C. V.; CAMARÃO, E. B. Estudo de compostos orgânicos em lixiviado de aterros sanitários por EFS e CG/EM. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 554-556, 2001.

OHE, T.; WATANABE, T.; NONOUCHI, Y.; HASEI, T.; AGOU, Y.; TANI, M.; WAKABAYASHI, K. Identification of a new mutagen, 4,4-diamino-3,3-dichloro-5-nitrobiphenyl, in river water flowing through an industrial area in Wakayama, Japan. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 655, p. 28–35, 2008.

OHE, T.; WHITE, P. A.; DEMARINI, D. M. Mutagenic characteristics of river waters flowing through large metropolitan areas in North America. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 534, p. 101-112, 2003.

PAWLISZYN, J. **Sampling and sample preparation in field and laboratory**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier Science B. V., 2002

PEREIRA, T. S.; ROCHA, J. A. V.; DUCCATTI, A.; SILVEIRA, G. A.; PASTORIZA, T. F.; BRINGUENTI, L.; VARGAS, V. M. F. Evaluation of mutagenic activity in supply water at three sites in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 629, p. 71–80, 2007.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. 356 p.

RICHLING, E.; HÄRING, D.; HERDERICH, M.; SCHREIER, R. Determination of heterocyclic aromatic amines (HAA) in commercially available meat products and fish by high performance liquid chromatography - Electrospray Tandem Mass Spectrometry (HPLC-ESI-MS-MS). **Chromatographia**, Würzburg, v. 48, p. 258-262, 1998.

RICKERT, W. S.; WRIGHT, W. G.; TRIVEDI, A. H.; MOMIN, R. A.; LAUTERBACH, J. H. A comparative study of the mutagenicity of various types of tobacco products. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 48, p. 320–330, 2007.

RODRIGUES, F. P. **Ensaio biológicos de genotoxicidade e mutagenicidade de um efluente de refinaria de petróleo**. 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

SATO, M.; KARASAWA, N.; SHIMIZU, M.; MORIMATSU, F.; YAMADA, R. Safety evaluation of chicken breast extract containing carnosine and anserine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 480–489, 2008.

SEVERIN, I.; DUMONT, C.; JONDEAU-CABATON, A.; GRAILLOT, V.; CHANGNON, M. C. Genotoxic activities of the food contaminant 5-hydroxymethylfurfural using different in vitro bioassays. **Toxicology Letters**, v. 192, p. 189–194, 2010.

SISENANDO, H. A. A. A. C. N.; MACEDO, M. F. S.; SATURNINO, A. C. R. D.; COELHO, L. C. B. B. Evaluation of the genotoxic potential of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL). **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 303–308, 2009.

SUJBERT, L.; RÁCZ, G.; SZENDE, B.; SCHRÖDER, H. C.; MÜLLER, W. E. G.; TÖRÖK, G. Genotoxic potential of by-products in drinking water in relation to water disinfection: Survey of pre-ozonated and post-chlorinated drinking water by Ames-test. **Toxicology**, v. 219, p. 106-112, 2006.

UMBUZEIRO, G. A.; ROUBICEK, D. A.; RECH, C. M.; SATO, M. I. Z.; CLAXTON, L. D. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the *Salmonella* assay and different water extraction procedures. **Chemosphere**, Oxford, v. 54, p. 1589-1597, 2004.

VALENT, G.U. **Avaliação da atividade mutagênica de extratos orgânicos de corpos d'água do Estado de São Paulo através do teste de Ames**. Campinas: UNICAMP, 134f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, 1990.

VALENTE-CAMPOS, S.; DIAS, C. L.; BARBOUR, E. D. A.; NASCIMENTO, E. S.; UMBUZEIRO, G. A. The introduction of the *Salmonella*/microsome mutagenicity assay in a groundwater monitoring program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 675, p. 17–22, 2009.

VARGAS, V. M. F.; MIGLIAVACCA, S. B.; MELO, A. C.; HORN, R. C.; GUIDOBONO, R. R.; FERREIRA, I. C. F. S.; PESTANA, M. H. D. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 490, p 141-158, 2001.

VERSCHAEVE, L.; VAN STADEN, J. Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African traditional medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 575–587, 2008.

WANG, L.; BARRINGTON, S.; KIM, J. Biodegradation of pentyl amine and aniline from petrochemical wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 83, p.191-197, 2007.

WATANABE, T.; TAKAHASHI, K; KONISHI, E.; HOSHINO, Y.; HASEI, T.; ASANOMA, m. HIRAYAMA, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagenicity of surface soil from residential areas in Kyoto city, Japan, and identification of major mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 649, p. 201–212, 2008.

XU, J.; YU, Y.; WANG, P.; GUO, W.; DAI, S.; SUN, H. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the surface sediments from Yellow River, China. **Chemosphere**, v. 67, p.1408-1414, 2007.

ZAROONI, M.; ELSHORBAGY, W. Characterization and assessment of Al Ruwais refinery wastewater. **Journal Of Hazardous Materials**, v. 136, p.398-405, 2006.

## 8 ASSINATURAS

---

Dejanira de Franceschi de Angelis  
Orientadora

---

Dilza A. Nalin  
Co-orientadora

---

Ana Carolina A. Pereira  
Aluna