

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises
Toxicológicas

**Avaliação da atividade mutagênica de águas superficiais
utilizadas para abastecimento público após tratamento na
bacia dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá**

Daniela Dayrell França

Dissertação para obtenção do
grau de MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros

São Paulo
2006

Daniela Dayrell França

**Avaliação da atividade mutagênica de águas superficiais
utilizadas para abastecimento público após tratamento na
bacia dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de 2006.

"Waves that crash on the shoreline
Torrents of tropical rain
Streaming down beyond our memory
Streaming down inside our veins"

Neil Peart

"Where we start is where we end"

David Gilmour

*Aos meus pais, Afonso e Glória, por todos os meus genes
e apoio incondicional em todas
as etapas da minha vida; à Tia Mariza, pela luz*

“If the future's looking dark
We're the ones who have to shine
If there's no one in control
We're the ones who draw the line
Though we live in trying times -
We're the ones who have to try
Though we know that time has wings -
We're the ones who have to fly”
Neil Peart

*Aos meus amigos Vanessa, Gonzales, Giulianna, Thiago e
Quarteto Fantástico pelo compartilhamento da minha loucura*

"Somewhere, something incredible is waiting to be known"

Carl Sagan

"The cure for a fallacious argument is a better argument, not
the supression of ideas"

Carl Sagan, The Demon Haunted World

*Às minhas orientadoras Sílvia Berlanga e Gisela Umbuzeiro
pela inserção do gene da inquietude e por sempre
encorajarem o debate de idéias*

AGRADECIMENTOS

À equipe da CETESB pelo apoio na realização deste trabalho e amizade, Wálace, Célia, Paulo, Fábio, Dani, Debbinha, Débora, Camila, Carlos, Viana, Genival e Ângela,

Às minhas irmãs Camila e Cristina pela paciência durante o latifúndio computacional,

Ao meu novo-velho amigo Osmar pelo apoio tecnológico,

Aos colegas do t4e por sempre terem compreendido (e compartilhado) minhas ausências,

Aos colegas de pós-graduação Simone, Patrícia, Ana, Tânia, Cris e toda a turma da Patologia pela ajuda e risadas constantes,

Aos funcionários e colegas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas e também da secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, sempre dispostos a ajudar,

Ao William e Thomas por me apresentarem o ribeirão Jacaré,

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado,

A todas as demais pessoas que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho.

RESUMO

Compostos mutagênicos/genotóxicos podem não ser removidos durante os processos convencionais de tratamento de água para consumo humano e podem provocar mutações em células somáticas e/ou germinativas, o que pode trazer agravos à saúde humana.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade genotóxica em águas brutas coletadas em seis locais (Itatiba, Valinhos, Sumaré, Indaiatuba, Jundiaí e Artur Nogueira) onde ocorre captação para abastecimento público, na bacia dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí (Estado de São Paulo), que não têm sua mutagenicidade caracterizada. Foi empregado o teste de Salmonella/microsoma, combinado a processos de extração orgânica (resina XAD), com as linhagens TA98, TA100 e YG1042. A linhagem YG1041 teve seu uso avaliado no monitoramento de águas superficiais. Foram avaliados também diferentes critérios de positividade para o teste e o emprego de diferentes doses máximas testadas.

Quatro captações avaliadas apresentaram resultados negativos enquanto as captações de Sumaré e Valinhos apresentaram atividade mutagênica. O ribeirão Jacaré foi identificado como uma das fontes da mutagenicidade impactando na captação de Valinhos. A potência máxima detectada, na captação de Sumaré, atingiu 1020 rev/L para a linhagem TA98 na ausência de ativação metabólica e 2600 rev/L para a TA100 com ativação metabólica, potências consideradas moderada e alta, respectivamente. Estes resultados levaram à inclusão do teste de Salmonella/microsoma no monitoramento realizado pela CETESB nas captações de Valinhos e Sumaré a partir de 2006.

ABSTRACT

Mutagenic/genotoxic compounds may persist after conventional treatment for drinking water production and may induce mutations on somatic or germinative cells which can lead to human health damage.

The objective of this study was to evaluate the genotoxic activity in surface water samples at 6 sites (Itatiba, Valinhos, Sumaré, Indaiatuba, Jundiaí and Artur Nogueira) located at Piracicaba, Capivari and Jundiaí river systems (São Paulo state). These sites are used as source for drinking water and were not previously screened for mutagenic activity. The organic extract (XAD resin) was tested for mutagenicity with the Salmonella assay using TA98, TA100 and YG1042 strains and YG1041 strain had its use in surface water monitoring evaluated. Different criteria for analyzing Salmonella/microsoma assay data were also evaluated as well as the use of different highest doses.

Four evaluated sites elicited negative results while Sumaré and Valinhos samples presented mutagenic activity. Jacaré river was identified as one of the mutagenic activity sources with impact on Valinhos drinking water source. Maximum mutagenic potency, detected at Sumaré water source, were 1020 rev/L for TA98 in the absence of S9 mix and 2600 rev/L for TA100 in the presence of S9 mix. These potency values are classified as moderate and high, respectively. These results lead to the inclusion of the Salmonella/microsoma assay into the monitoring program performed by CETESB (São Paulo State Environmental Protection Agency) at Valinhos and Sumaré from 2006 on.

A parte prática deste trabalho foi realizada integralmente na Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), como parte do projeto denominado "Atualização e aperfeiçoamento de metodologias analíticas", etapa 9 - "Avaliação da necessidade de inclusão de novos pontos de coleta de água superficial utilizadas para consumo humano na rede de monitoramento da CETESB", sob coordenação de Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Teste de Salmonella.....	05
1.2. Critérios de positividade do teste de Salmonella.....	09
1.3. O monitoramento da qualidade das águas no Estado de São Paulo e o teste de Salmonella.....	11
1.4. Bacia dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá.....	14
1.5. Atividade mutagênica de águas superficiais e tratadas.....	15
1.5.1. Água superficial.....	15
1.5.2. Água tratada.....	16
1.5.3. Fontes de contaminação de águas superficiais.....	17
2. OBJETIVO.....	21
2.1. Objetivos específicos.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Material.....	24
3.1.1. Meios de cultura e soluções.....	24
3.1.2. Esterilização.....	27
3.1.3. Lavagem de vidraria.....	27
3.1.4. Descarte de material.....	27
3.2. Métodos.....	28
3.2.1. Área de estudo.....	28
3.2.2. Coleta das amostras.....	31
3.2.3. Extração das amostras.....	32
3.2.4. Teste de Salmonella/microsoma.....	33
3.2.4.1. Preparo da placa-master.....	34
3.2.4.2. Verificação das características genéticas das linhagens....	35
3.2.4.3. Procedimento do ensaio.....	37
3.2.4.4. Interpretação de resultados e análises estatísticas.....	39
4. RESULTADOS	43
4.1. Atividade mutagênica dos corpos d'água avaliados.....	44
4.2. Investigação das fontes de atividade mutagênica.....	47
4.3. Avaliação da utilização da linhagem YG1041 no monitoramento de águas superficiais.....	48

5. DISCUSSÃO.....	51
5.1. Atividade mutagênica dos corpos d'água avaliados.....	52
5.2. Investigação das fontes de atividade mutagênica.....	54
5.3. Avaliação da utilização da linhagem YG1041 no monitoramento de águas superficiais.....	56
5.4. Avaliação de diferentes critérios de positividade.....	58
5.5. Avaliação do aumento da dose máxima testada.....	61
5.6. Relevância ambiental dos dados.....	64
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
6.1. Recomendações.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
8. ANEXO.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela

1. Linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> utilizadas no teste de Salmonella em águas superficiais.....	9
2. Características genéticas das linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> utilizadas neste estudo.....	34
3. Controles positivos e suas concentrações utilizadas neste trabalho...	39
4. Atividade mutagênica detectada nas amostras de água bruta com as linhagens TA98, TA100, YG1041 e YG1042 na presença e ausência de S9 com dose máxima de 50mL eq./placa.....	44
5. Atividade mutagênica detectada nas amostras de água bruta no rio Atibaia a jusante do rib. Jacaré com as linhagens TA98, TA100 e YG1042 na presença e ausência de S9 com dose máxima de 50mL eq./placa....	47
6. Atividade mutagênica detectada nas amostras de água bruta com a linhagem YG1041 na presença e ausência de S9 com dose máxima de 50mL eq./placa.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura

1. Mapa da bacia do Piracicaba, Capivari e Jundiaí, com os pontos escolhidos para amostragem..... 31
2. Esquema de extração de amostras de água por XAD4 em pH da amostra e após acidificação das amostras..... 33
3. Esquema do teste de *Salmonella*/microsoma – método em microssuspensão..... 38
4. Típica curva dose-resposta de uma amostra mutagênica..... 40
5. Curvas de atividade mutagênica detectada nas amostras de água bruta com a linhagem TA98 na presença e ausência de S9..... 45
6. Curvas de atividade mutagênica detectada nas amostras de água bruta com a linhagem TA100 na presença e ausência de S9..... 46
7. Curvas de atividade mutagênica detectada nas amostras de água bruta com a linhagem YG1042 na presença e ausência de S9..... 46
8. Curvas de atividade mutagênica detectada nas amostras do rio Atibaia a jusante do rib. Jacaré com as linhagens TA98 e YG1042 na presença e ausência de S9..... 48
9. Curvas de atividade mutagênica detectada nas amostras com a linhagem YG1041 na presença e ausência de S9..... 49
10. Comparação entre a presença e ausência de ativação metabólica para a linhagem TA98 para as amostras de água bruta com resultados positivos..... 53
11. Comparação entre a presença e ausência de ativação metabólica para as linhagens TA100 e YG1042 para as amostras de água bruta com resultados positivos..... 54
12. Comparação entre a presença e ausência de ativação metabólica para as linhagens TA98 e YG1042 para as amostras de água bruta do rio Atibaia a jusante do rib. Jacaré com resultados positivos..... 55
13. Comparação entre as linhagens TA98 e YG1041 na ausência de ativação metabólica para as amostras de água bruta com resultados positivos..... 56

14. Comparação entre as linhagens TA98 e YG1041 na presença de ativação metabólica para as amostras de água bruta com resultados positivos.....	57
15. Comparação do número de resultados positivos e indícios de mutagenicidade frente aos diferentes critérios empregados.....	59
16. Comparação entre o número de resultados positivos e indícios de mutagenicidade observados com diferentes doses máximas testadas...	62
17. Comparação entre as potências da mutagenicidade observada para cada dose máxima testada.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

CETESB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo

CONAMA: Conselho Nacional de Meio Ambiente

DAE: Departamento de Água e Esgoto

DAEV: Departamento de Água e Esgoto de Valinhos

DBO: demanda bioquímica de oxigênio

DMSO: dimetilsulfóxido

DQO: demanda química de oxigênio

EPA: Environmental Protection Agency

ETA: estação de tratamento de água

ETE: estação de tratamento de esgoto

HPA: hidrocarboneto policíclico aromático

IAP: índice de qualidade da água bruta para fins de abastecimento público

IARC: International Agency for Research on Cancer

ISTO: índice de substâncias tóxicas e organolépticas

IQA: índice de qualidade de águas

NADP: β -fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo

OD: oxigênio dissolvido

ppm: partes por milhão

ppb: partes por bilhão

q.s.p.: quantidade suficiente para

SAAE: Sistema Autônomo de Água e Esgoto

SABESP: Companhia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo

SAEAN: Sistema de Água e Esgoto de Artur Nogueira

SBMCTA: Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental

THMs: Trihalometanos

UV: ultravioleta

WHO: World Health Organization

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Historicamente, a disponibilidade de água constitui fator importante para a fixação humana no planeta, assim, muitas cidades desenvolveram-se em torno de rios, lagos ou água subterrânea de fácil acesso (OHE *et al.*, 2003). A água é relacionada aos mais diversos usos, muitos deles conflitantes, como o abastecimento público, irrigação e afastamento de efluentes domésticos e industriais (CETESB, 2005).

Com a industrialização e crescimento das atividades humanas no planeta, fez-se cada vez mais necessário intervir na proteção do meio ambiente, não só como um fim em si, mas também visando à proteção da saúde humana. Novas atividades trouxeram novos poluentes, exigindo novos procedimentos analíticos, e trazendo a descoberta de que velhos problemas eram mais graves do que se pensava.

As águas superficiais são o destino de grande quantidade de efluentes industriais, agrícolas, domésticos, além de receber substâncias carregadas pelas chuvas. Os efluentes e substâncias carregadas são freqüentemente tóxicos ou podem resultar em alteração do ecossistema do corpo d'água receptor (WHITE & RASMUSSEN, 1998).

Estima-se que nos Estados Unidos, mais de 800 ton³ de compostos lançados nas águas superficiais e 60.000 ton³ lançados na atmosfera sejam carcinógenos classificados como 1, 2A ou 2B pelo IARC e muitos deles têm atividade mutagênica conhecida (OHE *et al.*, 2004). Nesse panorama, o estudo da genotoxicidade, especialmente da atividade mutagênica da água, ar, solo, efluentes industriais, compostos químicos, entre outros, tornou-se fundamental para a melhor compreensão de como o meio ambiente e seus poluentes podem causar danos à vida, sendo a mutagenicidade objeto de estudos em diversas partes do mundo (GALASSI *et al.*, 1992; LANGEVIN *et al.*, 1992; KUSAMRAN *et al.*, 1994; REHANA *et al.*, 1996; KATAOKA *et al.*, 2000; UMBUZEIRO *et al.*, 2001).

Os seres humanos sofrem tanto mutações espontâneas quanto induzidas e estão expostos a mutágenos durante toda a vida. Fontes de

exposição a mutágenos incluem agentes tóxicos no ambiente, alimentos, produtos de limpeza, medicamentos, entre outros (MALLING, 2004).

A determinação e identificação de compostos genotóxicos presentes em águas utilizadas para abastecimento é um passo fundamental para a predição dos efeitos do consumo desta mistura complexa em humanos. Apesar do senso comum de que o maior risco dos compostos mutagênicos seja a indução de câncer, atualmente há evidências de que as mutações de ponto podem provocar danos em células germinativas ou somáticas levando ao desenvolvimento de outras doenças como: doenças hereditárias, cardiovasculares, anemia, distúrbios reprodutivos, neurocomportamentais e do desenvolvimento, além do impacto no processo de envelhecimento (DEARFIELD *et al.*, 2002). Mutações em células somáticas senescentes, como os neurônios, podem estar envolvidas em doenças como Kuru ou Alzheimer (LENDON *et al.*, 1997).

Os ensaios de genotoxicidade, ao contrário das análises químicas, permitem a detecção de efeitos combinados dos compostos presentes em uma amostra, inclusive seus efeitos sinérgicos, antagônicos, de metabólitos ativos, de produtos de degradação ou ainda a detecção de substâncias desconhecidas (HELMA *et al.*, 1996). Os bioensaios não requerem ainda informações prévias sobre a composição química e podem avaliar a genotoxicidade de amostras complexas (CLAXTON *et al.*, 1998). Dentre estes testes, em seus diversos *end-points*, o mais utilizado em todo o mundo para a avaliação de águas superficiais é o de Salmonella/microsoma (OHE *et al.*, 2004). Por ser tão utilizado, o teste de Salmonella/microsoma está bastante desenvolvido e tecnicamente validado para ser utilizado em ensaios rotineiros para avaliação da mutagenicidade de águas superficiais (REHANA *et al.*, 1995).

Em 1998 foi introduzido na Rede de Monitoramento da Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo da CETESB o teste de Salmonella/microsoma (ESTADO DE SÃO PAULO, 1998), com as linhagens TA98 e TA100, com o propósito de aprimorar a avaliação dos corpos d'água com relação à presença de substâncias orgânicas tais

como aminas aromáticas, HPAs entre outras, em níveis que possam provocar mutagenicidade, passando a fazer parte do cálculo do IAP (índice de qualidade das águas brutas para fins de abastecimento público) (UMBUZEIRO *et al.*, 2001). Com os resultados obtidos pelo teste de Salmonella/microsoma pode-se priorizar os locais onde devem ser realizados estudos mais detalhados das possíveis fontes de contaminação, assim como determinações químicas dos compostos orgânicos possivelmente genotóxicos presentes nesses corpos d'água (CLAXTON *et al.*, 1998).

Existem porém várias captações de água bruta utilizada para abastecimento público onde o monitoramento realizado pela CETESB somente compreende alguns parâmetros de ordem sanitária (oxigênio dissolvido, coliformes, DBO, DQO, entre outros), sendo captações de potencial genotóxico não caracterizado.

Os processos convencionais de tratamento da água para abastecimento podem não ser capazes de eliminar compostos genotóxicos e ainda a cloração, há muito utilizada como um processo simples, efetivo e econômico de desinfecção da água, forma produtos genotóxicos pela interação do cloro com compostos húmicos naturalmente presentes na água ou outros xenobióticos (VARTIAINEN & LIIMATAINEN, 1986; SCHENCK *et al.*, 1998; PARK *et al.*, 2000; MONARCA *et al.*, 2004).

Assim sendo, é de fundamental importância que se realizem outras análises para complementar a avaliação já realizada nos pontos de captação da água para abastecimento especialmente no que se refere à presença de compostos mutagênicos. Os resultados obtidos irão indicar a necessidade de uma avaliação mais abrangente e detalhada nos pontos estudados que apresentarem resultados positivos para o teste de Salmonella/microsoma, bem como a necessidade de medidas de controle e prevenção da contaminação em questão.

1.1. Teste de Salmonella

O teste de Salmonella/microsoma foi desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames no começo da década de 70 (AMES, 1971; AMES *et al.*, 1975). Ames estudava a estrutura e função do operon da síntese de histidina e com isso produziu um número variado de mutantes de *Salmonella typhimurium*. Mais tarde, Ames percebeu que algumas linhagens mutantes poderiam ser usadas para detectar compostos mutagênicos pela sua capacidade de reverter estas mutações.

Este teste foi revisado por MARON & AMES (1983) e por MORTELMANS & ZEIGER (2000), sendo que CLAXTON e colaboradores (1987), visando maior padronização dos ensaios, definiram as principais diretrizes para a realização do teste.

Por ser um método sensível, confiável e por poder ser realizado em pouco tempo, com custo relativamente baixo, o teste de Salmonella tornou-se essencial em qualquer bateria de testes para avaliação genotoxicológica de qualquer matriz ambiental (ZEIGER, 2004). É ainda o teste recomendado pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998) e pela U.S. EPA (USEPA, 1989).

O teste utiliza linhagens de *Salmonella typhimurium* geneticamente modificadas, derivadas da linhagem parental LT2, capazes de detectar compostos químicos que causam mutações gênicas por deslocamento do quadro de leitura ou por substituição dos pares de bases do DNA (MARON & AMES, 1983). Em função das alterações genéticas, as linhagens são auxotróficas para a histidina, portanto são incapazes de crescer em meio pobre neste aminoácido. As linhagens apresentam diferentes mutações em um dos genes do operon responsável pela síntese de histidina, assim apenas as células que reverterem a mutação no gene da histidina, passando a ser prototróficas para a mesma, serão capazes de crescer, produzindo colônias (UMBUZEIRO & VARGAS, 2003).

Existem diferentes tipos de mutações no gene da histidina, as linhagens empregadas neste trabalho apresentam duas delas. A mutação

hisG46, presente nas linhagens TA100 e YG1042, consiste na troca de uma leucina (GAG/CTC) por uma prolina (GGG/CCC). Esta mutação é revertida por mutágenos que provocam trocas de pares de base. Já as linhagens TA98 e YG1041 contêm a mutação *hisD3052*, mutação -1 que afeta o quadro de leitura de uma sequência repetitiva -C-G-C-G-C-G-. Mutágenos que alteram o quadro de leitura como o 2-nitrofluoreno podem reverter essa mutação (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

As linhagens de *S. typhimurium* empregadas no teste ainda apresentam outras mutações que aumentam sua suscetibilidade a mutações e conseqüentemente a sensibilidade do teste. A mutação *rfa* altera a parede bacteriana, aumentando a permeabilidade da parede celular e permitindo a passagem de compostos químicos maiores, como aminas aromáticas e HPAs. A maior parte das linhagens apresenta deleção de um dos genes responsáveis pelo reparo de excisão, *uvrB*, manipulação genética que provocou a deleção de parte do gene responsável pela síntese de biotina, tornando as linhagens teste auxotróficas para esta vitamina. Neste trabalho foram empregadas linhagens que apresentam o plasmídeo pKM101, marcado com o gene de resistência à ampicilina e contendo o gene *muc*, cuja proteína diminui a fidelidade da DNA polimerase estimulando o reparo SOS, passível de erro, facilitando a ocorrência de mutações (MARON & AMES, 1983).

Em virtude da deleção do gene *uvrB*, as linhagens de *Salmonella* são sensíveis à radiação UV, assim são utilizadas lâmpadas amarelas (ao contrário de lâmpadas brancas convencionais) no laboratório, pois estas não emitem radiação UV. Esta medida também previne a foto-oxidação de compostos que estejam sendo determinados.

Como alguns compostos tornam-se carcinógenos ou mutágenos para mamíferos apenas após a biotransformação para formas ativas, como aminas aromáticas e HPAs, MALLING (1971) desenvolveu um sistema de metabolização *in vitro*. Ames incorporou a idéia em seu teste e chamou-o de fração microssomal S9 (AMES *et al.*, 1973), tornando rotineira a idéia da realização de ensaios com ativação metabólica (MALLING, 2004). Esta fração é constituída pelo sobrenadante de fígado

de rato tratado com o indutor de P450, AROCLOR 1254, após centrifugação a 9000 g. A mistura S9 utilizada no ensaio é preparada com a adição de co-fatores como NADP, entre outros, para garantir a atividade do sistema (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

O advento da metabolização *in vitro* estabeleceu uma relação definitiva entre carcinogênese e mutagênese, embora se saiba que existem diversos carcinógenos para roedores que não são mutagênicos ou clastogênicos, atuando nas fases de promoção e progressão do tumor (ZEIGER, 2004). Assim, o teste de Salmonella, dentre outros testes de genotoxicidade, é utilizado como teste de triagem na determinação do potencial carcinogênico, visto que existe correlação entre a resposta positiva no teste de Salmonella e carcinogenicidade em roedores (MORTELMANS & ZEIGER, 2000). Apesar desta correlação ter sido discutida, variando entre 90% em alguns trabalhos (McCANN *et al.*, 1975) até 66% em outros (ZEIGER *et al.*, 1990), não é baixa o suficiente para que o ensaio tenha sua importância reduzida (ZEIGER, 2004).

Amostras ambientais líquidas podem ser testadas *in natura* (após filtração para remoção de microorganismos) frente ao teste de Salmonella, porém para resultados mais confiáveis é ideal utilizar métodos de extração/concentração em amostras de águas superficiais, uma vez que os contaminantes geralmente estão presentes em concentrações relativamente baixas, em ppm ou ppb, difíceis de serem detectadas (OHE *et al.*, 2004). O método de extração mais utilizado em amostras de águas superficiais é a extração em resina XAD (OHE *et al.*, 2004).

A resina XAD pode extrair por adsorção uma ampla gama de compostos orgânicos, como HPAs, nitro-compostos, aminas aromáticas, entre outros. É especialmente utilizada quando a composição química da amostra é desconhecida (GUZZELLA & SORA, 1998). Para análises de pequenas quantidades de amostra disponíveis, ou para redução do volume de amostra utilizado, como é o caso de amostras ambientais, é adequado ainda o emprego do protocolo de Kado (microsuspensão) do teste de Salmonella, que utiliza as linhagens de Salmonella concentradas

10x e pré-incubação de 90 minutos, aumentando a sensibilidade do ensaio (KADO *et al.*, 1983).

Diversas linhagens de *Salmonella typhimurium* são empregadas no teste de Salmonella, com diferente sensibilidade aos tipos de danos genéticos. As linhagens mais utilizadas em todo o mundo são a TA98 e a TA100, que, em conjunto, são capazes de detectar 90% dos compostos mutagênicos conhecidos (MORTELMANS & ZEIGER, 2000). Recentemente, têm sido muito utilizadas linhagens com alta produção das enzimas acetiltransferase e nitro-redutase, como as YG (WATANABE *et al.*, 1989; WATANABE *et al.*, 1990; HAGIWARA *et al.*, 1993), que possuem plasmídios com cópias adicionais dos genes destas enzimas. A **Tabela 1** indica as principais linhagens de Salmonella utilizadas para análises de água superficial.

Tabela 1. Linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas no teste de Salmonella em águas superficiais (OHE *et al.*, 2004)

Linhagem	Descrição	Referência
Deslocamento no quadro de leitura		
TA98	<i>hisD3052, rfa, ΔuvrB</i> , pKM101	AMES <i>et al.</i> , 1975
TA98NR	TA98, mas deficiente na nitro-redutase clássica	ROSENKRANZ & SPECK, 1975
TA98/1,8DNP ₆	TA98, mas deficiente em O-acetiltransferase	McCOY <i>et al.</i> , 1981
YG1021	TA98 (pYG216): linhagem com alta produção de nitro-redutase	WATANABE <i>et al.</i> , 1989
YG1024	TA98 (pYG219): linhagem com alta produção de O-acetiltransferase	WATANABE <i>et al.</i> , 1990
YG1041	TA98 (pYG233): linhagem com alta produção de nitro-redutase e O-acetiltransferase	HAGIWARA <i>et al.</i> , 1993
Substituição de pares de base		
TA100	<i>hisG46, rfa, ΔuvrB</i> , pKM101	AMES <i>et al.</i> , 1975
YG1026	TA100 (pYG216): linhagem com alta produção de nitro-redutase	WATANABE <i>et al.</i> , 1989
YG1029	TA100 (pYG219): linhagem com alta produção de O-acetiltransferase	WATANABE <i>et al.</i> , 1990
YG1042	TA100 (pYG233): linhagem com alta produção de nitro-redutase e O-acetiltransferase	HAGIWARA <i>et al.</i> , 1993
Dano oxidativo		
TA102	<i>hisΔ(G)8476, rfa</i> , pAQ1(<i>hisG428</i> , pKM101)	LEVIN <i>et al.</i> , 1982

As linhagens YG apresentam maior sensibilidade para a detecção de compostos bioativados pelas enzimas acetiltransferase e nitro-redutase (HAGIWARA *et al.*, 1993). Portanto, uma resposta mais elevada

com as linhagens YG em comparação às suas linhagens parentais TA sugere a presença de aminas aromáticas na presença de S9 e de nitroaromáticos na ausência de S9 (OHE *et al.*, 2004). As respostas obtidas com diversas linhagens e procedimentos de extração podem ser indicativos da classe de compostos mutagênicos presentes na amostra (CERNÁ *et al.*, 1996; UMBUZEIRO *et al.*, 2004). Dentre as linhagens YG, a YG1042 (desenvolvida a partir da TA100) já foi utilizada no monitoramento de águas superficiais na CETESB. A linhagem YG1041 (desenvolvida a partir da TA98) porém, nunca foi empregada para este fim e há pouca base de dados sobre a sua utilização em estudos de monitoramento da qualidade das águas superficiais.

1.2. Critérios de positividade do teste de Salmonella

Desde o desenvolvimento do teste de Salmonella, diversas formas de interpretação dos resultados foram aplicadas. Ainda hoje o método de interpretação mais empregado é o desenvolvido por AMES e colaboradores (1975), critério conhecido como RM (razão de mutagenicidade) ≥ 2 ou “two-fold rule” (KIM & MARGOLIN, 1999).

A razão de mutagenicidade (RM) é a razão entre a média do número de revertentes na dose teste (espontâneos e induzidos) e a média do número de revertentes no controle negativo (espontâneos). De acordo com este critério, a amostra é considerada positiva quando apresenta RM igual ou maior do que 2, ou seja, quando a amostra é capaz, em pelo menos uma dose, de dobrar o número de revertentes observado no controle negativo.

Esta abordagem é extremamente simples, não requer nenhum tipo de análise estatística e utiliza a reversão espontânea como base, levando em consideração variações no ensaio que afetem todas as placas (CHU *et al.*, 1981). Em compensação, o critério trata igualmente linhagens com reversão espontânea muito baixa ou muito elevada e não tem o respaldo estatístico de considerar o número de doses testadas, o número de replicatas ou a significância estatística (CARIELLO & PIEGORSCH,

1996). O uso apenas deste critério pode ser radical demais para linhagens de Salmonella com baixa reversão espontânea, como as linhagens TA1537 e TA1538 (levando a mais falsos-positivos do que o aceitável) ou conservador demais para linhagens com reversão mais elevada, como TA102 e TA104 (resultando em mais falsos-negativos) (CARIELLO & PIEGORSCH, 1996).

Em função da falta de credibilidade estatística do critério do $RM \geq 2$, no fim dos anos 70, métodos estatísticos para interpretação de resultados do teste de Salmonella começaram a ser desenvolvidos. Existem diversos métodos estatísticos em utilização atualmente (MARGOLIN *et al.*, 1981; STEAD *et al.*, 1981; BERNSTEIN *et al.*, 1982), empregados especialmente por programas computacionais desenvolvidos para este fim (LEROUX & KREWSKI, 1993; CLAXTON *et al.*, 1995; KIM & MARGOLIN, 1999). Todos possuem vantagens e desvantagens, sendo que não existe consenso científico sobre qual modelo estatístico seria o mais adequado (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Outro critério de positividade empregado é a regra do percentual 95%. De acordo com este critério, é requerido que cada laboratório tenha um histórico das reversões espontâneas das diferentes linhagens de Salmonella em seus controles negativos. Para ser considerada positiva, uma amostra deve induzir reversão acima de 95% da população do histórico (CARNES *et al.*, 1985). Embora esta regra produza mais falsos positivos do que a regra do $RM \geq 2$, leva em consideração as variações nos controles de cada laboratório.

No teste de Salmonella, é fácil avaliar resultados claramente positivos, onde existe grande aumento dose-dependente na reversão, e resultados claramente negativos, onde a amostra não induz aumento na reversão, qualquer que seja o critério escolhido. Mas há inevitavelmente uma área entre estes dois extremos, onde os resultados não podem ser satisfatoriamente interpretados como positivos ou negativos (WEINSTEIN & LEWINSON, 1978; De SERRES & SHELBY, 1979).

A escolha de um critério deve considerar a finalidade da realização do ensaio. No monitoramento ambiental o teste de Salmonella é

empregado como uma ferramenta de avaliação de risco relativo. O teste de Salmonella, ao contrário de outros bioensaios que se utilizam de organismos representativos do próprio ambiente ou que se baseiam em correlações conhecidas, não avalia um risco quantificável. Porém se realizado sistematicamente, o teste é uma ferramenta de avaliação de piora ou melhora relativa de um ambiente. Assim, o que se espera de um critério de positividade para o teste de Salmonella aplicado a amostras ambientais é que seja capaz de separar os resultados claramente negativos e os claramente positivos (que podem exigir ação ambiental específica), mantendo uma região de resultados inconclusivos, diminuindo a probabilidade de resultados falso-negativos ou falso-positivos.

1.3. O monitoramento da qualidade das águas no Estado de São Paulo e o teste de Salmonella

Criada em 1968, a CETESB é a agência do Governo do Estado de São Paulo responsável pelo controle, fiscalização, monitoramento e licenciamento de atividades geradoras de poluição e em 1974, implantou a rede de monitoramento da qualidade das águas interiores, que atualmente compreende 161 pontos de monitoramento no Estado (CETESB, 2006).

A rede de monitoramento é complementada pelo monitoramento regional (antigamente denominado perfil sanitário) com 115 pontos e pelo monitoramento de sedimentos de água doce, com mais 18 pontos (CETESB, 2006).

Dada a impossibilidade de se monitorar todos os poluentes existentes, a CETESB faz uso de 50 indicadores de qualidade de água em sua rede de monitoramento, nos quais estão inseridos os parâmetros regulamentados pelas diversas leis estaduais e federais que regulam a qualidade das águas superficiais do Estado de São Paulo (BRASIL, 2005; ESTADO DE SÃO PAULO, 1976). Estes indicadores são:

Parâmetros Físicos: absorvância no ultravioleta, coloração da água, série de resíduos (filtrável, não filtrável, fixo e volátil), temperatura da água e do ar e turbidez.

Parâmetros Químicos: alumínio, bário, cádmio, carbono orgânico dissolvido, chumbo, cloreto, cobre, condutividade específica, cromo total, demanda bioquímica de oxigênio (DBO_{5,20}), demanda química de oxigênio, fenóis, ferro total, fluoreto, fósforo total, manganês, mercúrio, níquel, óleos e graxas, ortofosfato solúvel, oxigênio dissolvido, pH, potássio, potencial de formação de trihalometanos, série de nitrogênio (Kjeldahl, amoniacal, nitrato e nitrito), sódio, surfactantes (LAS) e zinco.

Parâmetros Microbiológicos: Coliformes termotolerantes, *Giardia* sp e *Cryptosporidium* sp.

Parâmetros Hidrobiológicos: clorofila-a, fitoplâncton, zooplâncton e bentos.

Parâmetros Toxicológicos: microcistinas, teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* (sistema Microtox[®]), teste de Salmonella/microsoma para a avaliação de mutagenicidade e teste de toxicidade aguda/crônica com *Ceriodaphnia dubia* (CETESB, 2006).

A CETESB, entretanto, não avalia sistematicamente todos os pontos da rede de monitoramento por meio de todos estes indicadores (CETESB, 2006).

As legislações sobre qualidade das águas superficiais em vigor no Estado de São Paulo (ESTADO DE SÃO PAULO, 1976; BRASIL, 2005) regulam algumas características físico-químicas, metais tóxicos e algumas substâncias orgânicas tóxicas como praguicidas na água. Entretanto, a atividade mutagênica ou genotóxica, seja por meio do teste de Salmonella ou de algum outro teste, não é um parâmetro legislado. Assim, muitas substâncias envolvidas nos processos de carcinogênese conhecidas ou desconhecidas não são reguladas em águas superficiais, direta ou indiretamente, no Estado de São Paulo.

Embora sendo utilizado no Brasil pela CETESB desde 1979, foi a partir de 1998 que o teste de Salmonella/microsoma foi introduzido de

forma sistemática em sua rede de monitoramento (ESTADO DE SÃO PAULO, 1998). Atualmente, a atividade mutagênica, por meio do teste de Salmonella, é parâmetro utilizado no cálculo do IAP – Índice de Qualidade da Água Bruta para fins de Abastecimento Público – utilizado pela CETESB. O IAP é calculado com base no IQA (Índice de Qualidade de Águas) e no ISTO (Índice de Substâncias Tóxicas e Organolépticas), composto pelo grupo de substâncias que afetam a qualidade organoléptica da água, bem como de substâncias tóxicas, incluindo metais, além de resultados do teste de Salmonella e do potencial de formação de trihalometanos (CETESB, 2005).

Atualmente, a CETESB monitora 70 captações de água para abastecimento público. Até 2003, 28 captações eram avaliadas também por meio do teste de Salmonella, mas em função de boa parte delas apresentarem constantes resultados negativos frente a este parâmetro, apenas 5 pontos mais problemáticos continuam sendo monitorados com o teste de Salmonella, sendo estes: reservatório Guarapiranga (GUAR00900), reservatório Billings – braço Taquacetuba (BITQ0100) e braço Rio Grande (RGDE02900), rio Cotia (COTI03900) e ribeirão dos Cristais (CRIS03400). Com exceção do braço Taquacetuba, estes pontos são captações que abastecem a região metropolitana da cidade de São Paulo (CETESB, 2006).

A importância do teste de Salmonella no monitoramento das águas superficiais pode ser atestada pelo estudo realizado no ribeirão dos Cristais, onde foi encontrada atividade mutagênica no ponto onde é feita a captação da ETA de Cajamar. Por meio deste teste foi comprovado que a responsável pelo efeito observado era uma empresa têxtil que lançava seus efluentes contendo corantes com atividade mutagênica – atendendo a todos os parâmetros da legislação vigente – a montante da captação (UMBUZEIRO *et al.*, 2004). Por meio de ações de controle realizadas pela CETESB, os efluentes industriais foram coletados e afastados, não mais impactando na qualidade da água captada para abastecimento público.

1.4. Bacia dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá

A bacia dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá localiza-se no Estado de São Paulo e a principal cidade da região é Campinas. A bacia compreende 57 municípios com população total de mais de 4 milhões de habitantes, sendo uma região de acentuado desenvolvimento industrial e uma das mais populosas do Estado. A agricultura destaca-se pela cultura de cana-de-açúcar, laranja, pinus e eucalipto (CETESB, 2006).

A bacia como um todo apresenta problemas tanto de disponibilidade de recursos hídricos quanto de disposição e tratamento de esgotos. A disponibilidade hídrica na região é de 400 m³/hab/ano, sendo que o considerado ideal pela Organização Mundial de Saúde é de 2.000 m³/hab/ano. Os 57 municípios da bacia geram cerca de 220 ton DBO/dia de esgotos, sendo que apenas 30% recebem tratamento; com o despejo dos esgotos a qualidade dos principais corpos d'água da região foi comprometida.

Em função dos lançamentos de esgotos sem tratamento, os principais rios da bacia encontram-se em processo de eutrofização, devido a altas cargas de fósforo total, com alterações em variáveis organolépticas (alumínio, ferro, manganês, fenóis, etc.) e sanitárias (OD, DBO, coliformes termotolerantes) (CETESB, 2005). A utilização dos corpos d'água para afastamento de efluentes industriais e domésticos sem tratamento prejudica a sua utilização para abastecimento público, uma vez que a pior qualidade da água bruta torna o tratamento mais oneroso.

Os municípios da região têm recebido estímulos governamentais ou mesmo estabelecido parcerias (como entre Campinas e Valinhos) para a despoluição dos rios, através da construção de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE). O Plano Diretor de Esgotos de Campinas prevê a construção de 21 ETEs.

1.5. Atividade mutagênica de águas superficiais e tratadas

1.5.1. Água superficial

A atividade mutagênica de águas superficiais tem sido estudada por diversos pesquisadores desde a década de 80, com a preocupação de se avaliar a sua contribuição para o potencial mutagênico das águas tratadas (OHE *et al.*, 2004). Em 2004, OHE e colaboradores publicaram revisão completa sobre o assunto. A seguir serão apresentados apenas alguns estudos de avaliação de mutagenicidade de águas superficiais.

UMBUZEIRO e colaboradores (2001), com base de dados de 20 anos de monitoramento da mutagenicidade de águas superficiais, propuseram uma classificação para águas superficiais de atividade mutagênica em função da potência observada no teste de Ames (MARON & AMES, 1983), baseada na classificação proposta por HOUK (1992) para efluentes industriais. A classificação proposta é atividade “baixa” para potência de até 500 revertentes (rev)/L, “moderada” de 500 a 2.500 rev/L, “alta” de 2.500 até 5.000 rev/L e “extrema” acima de 5.000 rev/L. Em 525 amostras de água utilizada para abastecimento público no Estado de São Paulo, 18% apresentaram atividade mutagênica com potências entre 12 a 3.625 rev/L; 79% da mutagenicidade foi detectada com a linhagem TA98.

Na Índia, rio Ganges, REHANA e colaboradores (1995) encontraram atividade mutagênica com potências entre 3.625 e 10.045 rev/L para a linhagem TA98. Encontraram ainda um perfil de mutagenicidade semelhante para uma mistura de pesticidas, sugerindo que esta poderia ser a fonte da mutagenicidade observada.

Na Europa, HELMA e colaboradores (1996) sugeriram que o efluente de uma planta petroquímica poderia ser responsável pela mutagenicidade detectada nos rios Wilga (Polônia) e Schwechat (Áustria) com potências entre 280 e 2.117 rev/L com as linhagens TA98 e TA100. Em geral, a atividade observada diminuía com a ativação metabólica. Os

rios Po e Adige, na Itália, apresentaram atividade mutagênica com potências de até 380 rev/L com as mesmas linhagens (GALASSI *et al.*, 1992)

Na América do Norte, OHE e colaboradores (2003) avaliaram a atividade mutagênica de rios nos Estados Unidos (rios Providence, Charles, Potomac e Hudson) e Canadá (Saint Lawrence) com a técnica de extração com Blue rayon *in situ* e encontraram potências de 300 a 18.400 rev/g Blue rayon. Foi verificada ainda predominância de resultados positivos com a linhagem YG1041 com ativação metabólica.

WATANABE e colaboradores (2002) investigaram a atividade mutagênica observada nos rios Mawatari, Asuwa e Kitsune no Japão, com potências acima de 500.000 rev/g Blue rayon para a linhagem YG1024 com ativação metabólica, e identificaram uma nova classe de compostos, derivados do 2-fenilbenzotriazol (PBTAs) que era responsável por pelo menos 50% da atividade observada.

1.5.2. Água tratada

A desinfecção da água durante o processo de tratamento é fundamental na prevenção de doenças de veiculação hídrica (WHO, 2004). O método mais utilizado em todo o mundo para a desinfecção da água é a cloração (ZANI *et al.*, 2005) e hoje sabe-se que o cloro livre pode reagir com compostos orgânicos presentes na água (naturalmente ou não), gerando produtos secundários de desinfecção com atividade mutagênica ou carcinogênica (ROOK, 1974), como os trihalometanos (THMs), 3-cloro-4(diclorometil)-5-5-hidróxi-2(5H)-furanona (MX), cloral hidratado e ácidos halogenados (MEIER, 1988; MONARCA *et al.*, 2004), alguns já legislados na Portaria 518 (BRASIL, 2004). Assim, a atividade mutagênica em águas tratadas é esperada (VARTIAINEN & LIIMATAINEN, 1986).

Apesar da baixa concentração destes compostos na água, estes poderiam representar um risco à saúde humana em função da exposição ao longo de toda a vida. Estudos epidemiológicos mostram associação

entre o consumo de água clorada e risco aumentado de incidência de câncer do trato urinário, gastrointestinal e de ocorrência de abortos espontâneos e má formação fetal (CANTOR, 1997; KOIVUSALO *et al.*, 1997; WALLER *et al.*, 1998; HWANG & JAAKKOLA, 2003). A filtração em carvão ativo pode ser eficiente na remoção de parte dos produtos secundários da desinfecção (EGOROV *et al.*, 2003).

A mutagenicidade observada na água tratada pode ser oriunda da contaminação de águas superficiais, da reação do cloro com compostos naturalmente presentes na água (como ácidos húmicos e/ou fúlvicos) ou dos sistemas de distribuição e armazenamento de água (MEIER, 1988). Apesar da formação dos produtos secundários da cloração, o processo de desinfecção da água nunca deve ser comprometido (WHO, 2004). Assim, como a quantidade de cloro utilizada na desinfecção é diretamente proporcional à quantidade de matéria orgânica presente na água bruta (ZANI *et al.*, 2005), os níveis destes produtos secundários podem ser consideravelmente reduzidos pela diminuição da quantidade de matéria orgânica presente na água bruta (VAN LEEUWEN, 2000).

É possível, por meio de processos de extração diferenciados, detectar separadamente com o teste de Salmonella os compostos genotóxicos esperados pelo processo de cloração e aqueles compostos genotóxicos oriundos de contaminação da água bruta (MEIER, 1988; KUMMROW *et al.*, 2003). Produtos secundários da cloração, formados a partir de compostos naturalmente presentes na água são detectados preferencialmente no ensaio com linhagens que detectam substituição de pares de base (como a TA100) sem ativação metabólica (MONARCA *et al.*, 1985; PARK *et al.*, 2000). Pela alta polaridade destes compostos, sua extração deve ser realizada em meio ácido, assim a extração de amostras de água tratada é feita no pH natural da amostra e em meio ácido e os extratos são testados separadamente no teste de Salmonella (PELLIZZARI *et al.*, 1984).

1.5.3. Fontes de contaminação de águas superficiais

Compostos genotóxicos podem atingir as águas superficiais por meio de despejo de efluentes líquidos. Muitas vezes as águas que recebem efluentes industriais ou domésticos são posteriormente utilizadas na agricultura, recreação ou mesmo como fonte de água potável (CERNÁ *et al.*, 1996).

Em função da complexidade da natureza química dos efluentes industriais, os bioensaios têm sido amplamente utilizados em sua avaliação genotóxica, sendo o teste de Salmonella o mais empregado nesta avaliação (HOUK, 1992). Existem diversos estudos que indicam que compostos genotóxicos antropogênicos estão presentes no meio aquático e podem ser associados a atividades industriais específicas (UMBUZEIRO *et al.*, 2004; VARGAS *et al.*, 1988).

HOUK (1992) revisou a genotoxicidade de efluentes industriais e os classificou de acordo com sua potência. Efluentes não tratados de processos industriais semelhantes apresentavam potência genotóxica dentro da mesma ordem de grandeza. As potências mais elevadas foram encontradas em efluentes de produção de furazolidona, nitrofurfural e ainda produção de compostos orgânicos e refinarias de petróleo.

Os processos de tratamento de efluentes industriais podem reduzir ou mesmo eliminar a mutagenicidade de um efluente (HOUK, 1992), entretanto o tratamento nem sempre reduz a genotoxicidade do efluente e pode às vezes, até mesmo aumentá-la (UMBUZEIRO *et al.*, 2005; CLAXTON *et al.*, 1998).

No caso de efluentes municipais, dependendo das características dos mesmos, o tratamento pode ser eficiente na remoção da genotoxicidade (JOLIBOIS & GUERBET, 2005) ou mesmo aumentá-la (MEIER *et al.*, 1987; HELMA *et al.*, 1996). Efluentes municipais incluem efluentes domésticos, comerciais, industriais, infiltrações de água subterrânea e águas pluviais com o arraste de substâncias da superfície. Embora seja difícil estimar as contribuições destes efluentes ao efluente municipal, em grandes cidades com mais de 200.000 habitantes a

contribuição volumétrica dos efluentes industriais ao efluente municipal é geralmente menor do que 25% (WHITE & RASMUSSEN, 1998).

Apesar de trabalhos internacionais mostrarem que efluentes municipais após processamento por ETEs podem ser genotóxicos, sua potência está muito abaixo das observadas para efluentes industriais. Entretanto, efluentes municipais tratados consistiriam um risco genotóxico às águas superficiais em função de sua alta vazão (WHITE & RASMUSSEN, 1998).

Além das fontes consideradas pontuais, como o lançamento de efluentes licenciados, existem ainda cargas difusas, de difícil caracterização, como a chuva e águas de irrigação da agricultura, que podem transportar contaminantes do ar e do solo para o corpo d'água, ou mesmo o sedimento que pode devolver compostos para a coluna d'água. Isto pode ser evidenciado pela recente detecção em amostras de solo (WATANABE *et al.*, 2005) e água de chuva (MURAHASHI *et al.*, 2003) do 3-nitrobenzantrone, potente mutágeno formado pela combustão incompleta de combustíveis fósseis (ENYA *et al.*, 1997).

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar a contaminação por compostos genotóxicos, utilizando o teste de Salmonella/microsossoma combinado a processos de extração orgânica (XAD), da água superficial de locais onde há captação para abastecimento público após tratamento, na bacia dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá.

2.1. Objetivos específicos

- No caso de mutagenicidade detectada, iniciar avaliação de fontes;
- Avaliar a utilização da linhagem YG1041 no monitoramento de águas superficiais;
- Determinar qual o critério de positividade mais adequado para o conjunto de resultados do trabalho;
- Determinar qual a dose máxima mais adequada para a avaliação de águas brutas neste trabalho por meio do teste de Salmonella em microcrossuspensão com extração em resina XAD.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Meios de cultura e soluções

- Meio de Vogel Bonner 50x

Composto por 10g de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 100g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 175g de fosfato de sódio e amônio ($\text{NaH}_2\text{N}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 500g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) e 1L q.s.p. de água destilada morna. Após esterilização, o meio deve ser estabilizado a 55°C em banho de água (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

- Solução de ágar

15g de ágar são dissolvidos em 180mL de água destilada. Após esterilização o meio deve ser estabilizado a 55°C em banho de água. Esta solução deve ser esterilizada por 30 minutos (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

- Solução de biotina e histidina 0,5mM

0,012g D-biotina e 0,011g de L-histidina são dissolvidos a quente em 100mL de água destilada. Após esterilização por filtração em membrana 0,45µm, a solução deve ser estocada em refrigerador (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

- Ágar mínimo

Este meio de cultura é composto por 200mL de solução de glicose 10%, 780mL de solução de ágar e 20mL de meio Vogel Bonner (50x). São distribuídos 20mL em placa de Petri (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

- Caldo nutriente

25g do caldo nutriente são dissolvidos em 1L de água destilada. Volumes de 20mL são distribuídos em frasco com tampa de rosca, e submetidos à esterilização em autoclave. O caldo nutriente utilizado deve ser Oxoid no.2, pois o processo de fabricação de outros caldos pode levar à formação de mutágenos a partir do extrato de carne (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

- Ágar de superfície

6g de Bacto ágar e 6g de cloreto de sódio são dissolvidos em 900mL de água destilada, sob aquecimento, sem ferver. Adicionar 100mL de solução de biotina/histidina 0,5mM e homogeneizar. Volumes de 150mL são distribuídos em frascos com tampa de rosca e submetidos à esterilização em autoclave (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

- Ágar Nutriente

Este meio de cultura é composto de 25g de caldo nutriente, 15g de ágar e 1L de água destilada quente. Após esterilização em autoclave são distribuídos 25mL em placa de Petri. O caldo nutriente utilizado deve ser Oxoid no.2 (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

- Solução de biotina 0,5mM

0,012g de D-biotina são dissolvidos a quente em 100mL de água destilada. A esterilização desta solução deve ser feita por membrana filtrante de 0,45 μ m (MILLIPORE) e armazenada em refrigerador em frasco escuro (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

- Solução de histidina 0,5%

0,5g de L-histidina são dissolvidos a quente em 100mL de água destilada. A esterilização desta solução deve ser feita por membrana filtrante de 0,45 μ m (MILLIPORE) e armazenada em refrigerador em frasco escuro (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

- Solução de ampicilina 8mg/mL

0,08g de ampicilina são dissolvidos em 10mL de hidróxido de sódio 0,02 mol.L⁻¹. A esterilização desta solução deve ser feita por membrana filtrante de 0,45µm (MILLIPORE) e armazenada em refrigerador em frasco escuro (MARON & AMES, 1983).

- Solução de canamicina 8mg/mL

0,08g de canamicina são dissolvidos em 10mL de água ultra pura. A esterilização desta solução deve ser feita por membrana filtrante de 0,45µm (MILLIPORE) e armazenada em refrigerador em frasco escuro (MARON & AMES, 1983).

- Solução de sais (cloreto de magnésio (MgCl₂.6H₂O) 0,4M: cloreto de potássio (KCl) 1,65M)

8,13g de cloreto de magnésio (MgCl₂.6H₂O) e 12,3g de cloreto de potássio (KCl) são dissolvidos em 100mL de água destilada. Após autoclavação, a solução deve ser mantida em refrigerador (MARON & AMES, 1983).

- Mistura S9 – 4% v/v

Cada 100mL de mistura S9 contém 4mL de fração S9, 2mL de solução de sais, 4mL 0,1M NADP, 0,5mL de 1M glicose-6-fosfato, 50mL de tampão fosfato 0,2M pH 7,4 e 39,5mL de água destilada. Esta solução deve ser preparada no dia do ensaio em ambiente estéril, mantida sob refrigeração durante seu uso e a solução não utilizada descartada. A esterilidade das soluções é verificada a cada utilização pela sua incubação em ágar nutriente por 15-18h (MARON & AMES, 1983).

- Tampão fosfato 0,2M

Solução A

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

Solução B

2,76g de fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) são dissolvidos em 100mL água destilada.

81mL da solução A e 19mL da solução B, são misturados e o pH ajustado para 7,4 com a solução A ou B. Após esterilização em autoclave, estocar o tampão em refrigerador (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

- Ágar mínimo para preparo de placas master

Proceder conforme o preparo do Ágar Mínimo (AM), adicionando para cada litro de AM: 0,66mL 0,5mM biotina, 8,12mL histidina 0,5% e 3,0mL ampicilina 8mg/mL (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

3.1.2. Esterilização

Todos os meios de cultura e soluções utilizados neste trabalho foram esterilizados em autoclave a 121°C (1 atm) por 20 minutos a não ser quando especificado. A esterilização da vidraria foi feita em estufa a 180°C, por 2 horas. Todas as placas de Petri e pipetas descartáveis utilizadas foram adquiridas previamente esterilizadas por radiação γ -cobalto.

3.1.3. Lavagem de vidraria

A vidraria foi lavada com detergente alcalino, enxaguada várias vezes e mantida em solução de ácido clorídrico/ ácido nítrico 30% (1:1) por 8 horas. Após esse período, o material foi enxaguado 8 a 10 vezes com água corrente e posteriormente lavado uma vez com água destilada. A vidraria de volume não-preciso foi seca em estufa a 50°C.

3.1.4. Descarte de material

Todo o material descartável utilizado foi autoclavado antes de ser descartado. Materiais contaminados com substâncias mutagênicas foram recolhidos separadamente e encaminhados para incineração.

3.2. Métodos

3.2.1. Área de estudo

A área selecionada para o estudo foi a bacia hidrográfica do Piracicaba, Capivari e Jundiáí, no Estado de São Paulo. Foram selecionados locais onde há captação de água bruta para abastecimento público após tratamento. Os locais escolhidos não são monitorados pela CETESB por meio do teste de Salmonella. Dentre os critérios utilizados para a escolha dos pontos estão a vulnerabilidade da bacia hidrográfica e o número de habitantes abastecidos, medido pela captação média da ETA. Também foi incluído um ponto considerado não poluído. O mapa da bacia, com os pontos escolhidos, está na **Figura 1**.

A descrição dos locais e o código do pontos utilizado pela CETESB estão detalhados a seguir. Também é apresentado o enquadramento de cada ponto no sistema de classificação de águas, conforme o decreto 10.755/77 (ESTADO DE SÃO PAULO, 1977) com base na resolução federal CONAMA 357 (BRASIL, 2005). Esta resolução classifica as águas doces em 5 classes de acordo com os usos a serem dados a suas águas. Os pontos de coleta estudados pertencem a 2 delas:

Especial: destinam-se ao abastecimento para consumo humano com desinfecção, à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas e à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral.

Classe 2: destinam-se ao abastecimento para consumo humano após tratamento convencional, à proteção das comunidades aquáticas, à recreação de contato primário, à irrigação de hortaliças e plantas frutíferas, à aqüicultura e à pesca.

Ponto 1

Local: Ribeirão Pirai

Cidade abastecida: Indaiatuba

Sistema produtor: SAAE Indaiatuba/Pref. Salto

Captação média: 0,277m³/s

Código: IRIS02900

Designação: Na barragem de captação dos municípios de Salto e Indaiatuba

Latitude: 23° 11' 12" **Longitude:** 47° 14' 44"

Classe: 2

Características: As amostras do ponto apresentaram em 2004 elevados níveis de fósforo total, que pode ser oriundo de despejos domésticos (CETESB, 2006).

Ponto 2

Local: Ribeirão Jundiaí-Mirim

Cidade abastecida: Jundiaí

Sistema produtor: DAE

Captação média: 1,350m³/s

Código: JUMI00800

Designação: Captação de Jundiaí

Latitude: 23° 09' 30" **Longitude:** 46° 54' 34"

Classe: Especial

Características: As amostras do ponto apresentaram em 2004 elevados níveis de fósforo total, que pode ser oriundo de despejos domésticos (CETESB, 2006).

Ponto 3

Local: Rio Atibaia

Cidade abastecida: Itatiba

Sistema produtor: SABESP

Captação média: 0,300m³/s

Código: ATIB02030

Designação: Captação de Itatiba. Rua Fioravante Piovani

Latitude: 22° 58' 09" **Longitude:** 46° 50' 52"

Classe: 2

Características: As amostras do ponto apresentaram em 2004 elevados níveis de coliformes termotolerantes, indicando contaminação por esgoto doméstico (CETESB, 2006).

Ponto 4

Local: Rio Atibaia

Cidade abastecida: Valinhos

Sistema produtor: DAEV

Captação média: 0,166m³/s

Código: ATIB02035

Designação: Captação de Valinhos

Latitude: 22° 56' 16" **Longitude:** 46° 56' 01"

Classe: 2

Características: As amostras do ponto apresentaram em 2004 elevados níveis de coliformes termotolerantes, indicando contaminação por esgoto doméstico (CETESB, 2006).

Ponto 5

Local: Rio Atibaia

Cidade abastecida: Sumaré

Sistema produtor: DAE

Captação média: 0,448m³/s

Código: ATIB02800

Designação: Captação de Sumaré, perto do Mini-Pantanal de Paulínia

Latitude: 22° 45' 41" **Longitude:** 47° 10' 24"

Classe: 2

Características: As amostras do ponto apresentaram em 2005 alta DBO, baixo OD, elevados níveis de fósforo, de coliformes termotolerantes, indicando contaminação por esgoto doméstico, e elevados níveis de nitrogênio amoniacal, indicando que existe contaminação recente (CETESB, 2006).

O transporte das amostras até o laboratório foi feito em temperatura ambiente e as amostras, quando não processadas imediatamente, foram armazenadas em câmara fria a 4°C por no máximo três dias (APHA, 1998).

3.2.3. Extração das amostras

Para a extração de amostras de água bruta foi empregada a resina Amberlite XAD4, polímero hidrofóbico de estireno-divinilbenzeno (DRESSLER, 1979). A resina foi previamente lavada para retirada de impurezas provenientes do seu processo de fabricação, de acordo com JUNK e colaboradores (1974) e PELLIZZARI e colaboradores (1984). Primeiramente a resina foi lavada com água ultrapura e metanol (três vezes cada), depois em Soxhlet com metanol por 48h. Após este procedimento, a resina pronta para uso foi armazenada em metanol.

A extração foi realizada no pH da amostra (N) e a seguir as amostras foram acidificadas até pH inferior a 2 para a extração ácida (H⁺), de acordo com KUMMROW e colaboradores (2003).

Colunas de vidro com placa porosa e com torneira de teflon foram preenchidas com a resina lavada. A quantidade de resina de cada coluna variou de acordo com o tipo e volume de amostra, seguindo a proporção de 1mL de resina/L de amostra para a água bruta.

Foi realizado o condicionamento das colunas com 1mL de metanol, 1mL de éter etílico e 2mL de diclorometano (substituído por acetato de etila no caso da coluna ácida) para cada mL de resina.

As colunas contendo a resina foram conectadas através de tubos de vidro por um sistema de sifonagem a frascos contendo 20L das amostras. A amostra passou primeiramente através da coluna N num fluxo de 20 mL por minuto e foi recolhida em frascos de 20L. Após a acidificação com HCl 0,1M, o mesmo processo foi realizado para a coluna H⁺, sendo a água final descartada. A **Figura 2** ilustra o procedimento de extração por XAD em pH natural da amostra e após acidificação. As colunas foram eluídas com 1mL de metanol e 4mL de diclorometano (coluna em pH da amostra) ou 1mL de metanol e 4mL de acetato de etila

(coluna ácida), proporções para cada 1mL de resina. Os extratos foram colocados em evaporador rotatório para retirada dos solventes a 40 °C, ressuspensos em cerca de 7mL dos solventes usados na eluição e transferidos para ampolas de Kuderna. Os extratos natural e ácido foram misturados (apenas a quantidade necessária para realização do ensaio), e então, transferidos para tubo de ensaio e secos sob fluxo de nitrogênio.

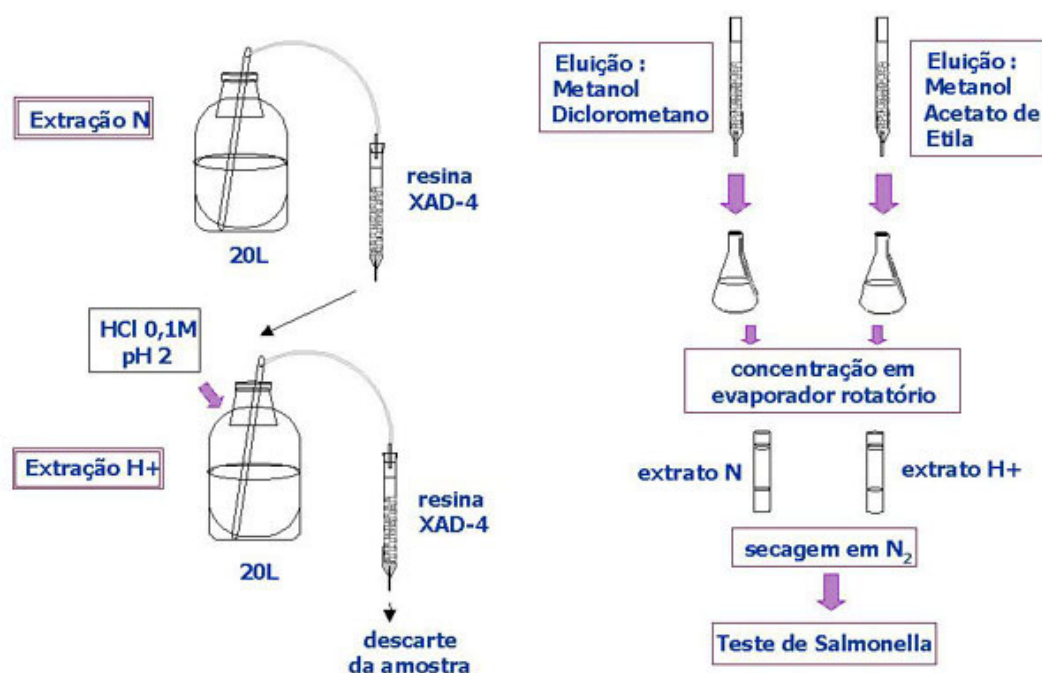


Figura 2. Esquema de extração de amostras de água por XAD4 em pH da amostra e após acidificação das amostras.

3.2.4. Teste de Salmonella/microssoma

O protocolo-teste escolhido foi o de microssuspensão (CETESB, 1991; KADO *et al.*, 1983), utilizando as linhagens TA98, TA100, YG1041 e YG1042 com e sem ativação metabólica da mistura S9 contendo 4% de fração S9 de fígado de rato induzido com aroclor-1254 e cofatores (MARON & AMES, 1983).

As características genéticas das linhagens empregadas neste trabalho tiveram sua presença rotineiramente verificadas por ocasião do preparo de placas-master no caso das linhagens TA e culturas de uso rotineiro no caso das linhagens YG.

A **Tabela 2** resume as principais características genéticas das linhagens de *Salmonella* empregadas neste trabalho.

Tabela 2. Características genéticas das linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas neste estudo

Linhagem	Plasmídio	Taxa de reversão espontânea*	Gene mutado	Tipo de mutação	LPS	<i>uvrB</i>	<i>bio</i>
TA98	pKM101 (amp ^r)	8-47	<i>hisD3052</i>	FS (CG)	<i>rfa</i>	-	-
TA100	pKM101 (amp ^r)	83-186	<i>hisG46</i>	BP (CG)	<i>rfa</i>	-	-
YG1041	pKM101 (amp ^r), pYG233 (cana ^r)	72-182	<i>hisD3052</i>	FS (CG)	<i>rfa</i>	-	-
YG1042	pKM101 (amp ^r), pYG233 (cana ^r)	67-208	<i>hisG46</i>	BP (CG)	<i>rfa</i>	-	-

FS: Frameshift (Quadro de leitura)

BP: Subst. par de base

CG: Alvo citosina

amp^r: ampicilina resistente

cana^r: canamicina resistente

LPS: Lipopolissacarídeo

* Intervalo considerado válido nos laboratórios da CETESB obtido através de análise estatística do histórico dos controles negativos com intervalo de confiança de 95%.

3.2.4.1. Preparo da placa-master

O armazenamento permanente das linhagens de *Salmonella typhimurium* foi realizado em freezer a -70°C, em ampolas com 0,9mL de cultura e 0,1mL de DMSO como agente crioprotetor. As culturas para uso rotineiro das linhagens TA98 e TA100 foram mantidas em placas de ágar mínimo enriquecido com biotina, histidina e ampicilina, em geladeira, denominadas placas-master. As linhagens YG1041 e YG1042 tiveram suas culturas para uso rotineiro mantidas em eppendorfs contendo 180µL de cultura e 20µL de DMSO em freezer -70 °C.

As placas-master foram preparadas a cada dois meses e as culturas em eppendorfs a cada seis meses. Na ocasião do preparo das culturas de uso rotineiro, as características genéticas de cada linhagem foram avaliadas e as culturas permanentes foram também preparadas. As linhagens não aprovadas nos testes genéticos e de reversão espontânea tiveram todas as suas culturas descartadas (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Uma alíquota de cultura permanente foi inoculada em 20mL de caldo nutriente contendo 62 μ L de antibióticos apropriados (ampicilina para as linhagens TA; ampicilina e canamicina para as YG) e, após incubação overnight (15-18 horas) sob agitação de 150 a 170 rpm, a cultura foi estriada em placas de ágar nutriente para isolamento de colônias.

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

Após incubação overnight sob agitação a 37°C, inoculou-se cada cultura na forma de estrias grossas em placas de ágar mínimo suplementado com biotina, histidina e ampicilina, e após incubação de 15-18 horas, as placas foram seladas com parafilme e mantidas invertidas sob refrigeração.

Cada cultura crescida nos 5mL de caldo nutriente foi também inoculada por meio de zaragatoas esterilizadas, em placas de ágar nutriente para verificação da presença da mutação *rfa*, do plasmídeo pKM101 (e pYG233 no caso das linhagens YG) e da deleção de *uvrB* e em placas de ágar com biotina e com biotina/histidina para verificação da dependência de histidina. Foi verificada também a reversão espontânea das culturas de cada colônia.

Cada cultura das linhagens YG foi ainda distribuída em 10 eppendorfs para a produção das culturas de uso rotineiro (CETESB, 1991).

3.2.4.2. Verificação das características genéticas das linhagens

Mutação rfa

Colocou-se discos de papel de filtro de 5mm de diâmetro embebidos com 10 μ L de solução cristal violeta 1% no centro da placa de ágar nutriente inoculada. O cristal violeta é um composto citotóxico de grande peso molecular. Após incubação, apenas as linhagens contendo esta mutação apresentam um halo de inibição de crescimento de no mínimo 14mm ao redor do disco.

Deleção uvrB

Metade de uma placa de ágar nutriente inoculada foi aberta e coberta com cartolina e irradiada com lâmpada germicida (UV 245nm) de 15 watts, por 15 segundos.

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

Presença do plasmídio pKM101

Com auxílio de uma alça de inoculação foi aplicada uma linha de solução de ampicilina 8mg/mL na placa de ágar nutriente. Após secar, a linhagem a ser testada foi estriada sobre a linha de antibiótico. Após incubação, as linhagens que perderam este plasmídio não apresentavam crescimento sobre a linha de antibiótico.

Presença do plasmídio pYG233

O procedimento é o mesmo descrito para o plasmídio pKM101, porém com utilização de solução de 8mg/mL de sulfato de canamicina como antibiótico.

Dependência de histidina

Cada cultura foi inoculada em uma placa com meio mínimo enriquecido com biotina e em outra enriquecida com biotina e histidina. As linhagens dependentes de histidina crescem apenas no meio suplementado com histidina.

Taxa de reversão espontânea

A taxa de reversão espontânea foi avaliada inoculando-se 100µL de cada cultura em 2mL de ágar de superfície, mantido em banho-seco a 47°C, e vertendo-se a mistura, após homogeneização, sobre uma placa de ágar mínimo. Cada cultura foi inoculada em triplicata.

A taxa de reversão espontânea foi avaliada após 66h de incubação a 37°C e deveria estar dentro da faixa esperada para cada linhagem.

As linhagens TA tiveram uma cultura escolhida com características genéticas adequadas. A placa-master correspondente foi usada como

inóculo durante os ensaios, pelo período de 2 meses. No caso das linhagens YG foram utilizadas todas as culturas com características genéticas adequadas.

3.2.4.3. Procedimento do ensaio

A avaliação da atividade mutagênica das amostras foi feita utilizando o protocolo desenvolvido por KADO e colaboradores. (1983), denominado de microssuspensão.

As culturas das linhagens TA foram inoculadas com alça de platina em 20mL de caldo nutriente, utilizando-se as placas-master como fonte de inóculo. Para as linhagens YG foram inoculados 100 μ L da cultura de uso rotineiro na mesma quantidade de caldo nutriente. Após crescimento overnight, por cerca de 15-18h, a 37°C sob agitação mecânica, as culturas foram centrifugadas a 6900 rpm por 10 minutos e foram ressuspensas em 4mL de solução de tampão fosfato 0,2M pH 7,4 diluído 1:13, sendo assim concentradas 5x. As culturas prontas foram mantidas sob refrigeração até o momento do teste.

Os extratos obtidos de acordo com o item 3.2.3 foram ressuspensos em DMSO, em diferentes diluições. Em cada tubo de ensaio, 5 μ L de cada dose foram adicionados a 50 μ L de tampão fosfato 0,2M diluído 1:13 (no caso do teste na ausência de ativação metabólica). Aos tubos foram adicionados 50 μ L da suspensão concentrada das linhagens (0,5 a 2×10^{10} células) e 50 μ L da mistura S9, nos tubos com ativação metabólica. Essa solução foi homogeneizada e incubada a 37°C por 90 minutos. Após esse período, foram adicionados 2mL de ágar de superfície, mantido em banho seco a 47°C, vertendo-se em placa de Petri contendo 20mL de ágar mínimo. Após solidificação, as placas foram incubadas invertidas, por 66 horas a 37°C. Cada dose foi testada em triplicata para cada condição. A **Figura 3** ilustra o procedimento do teste.

A quantificação do número de revertentes é feita pela contagem do número de colônias que cresceram em meio mínimo após a exposição de uma população de células às amostras-teste.

As amostras de água bruta foram testadas com dose máxima de 100mL equivalentes/placa.

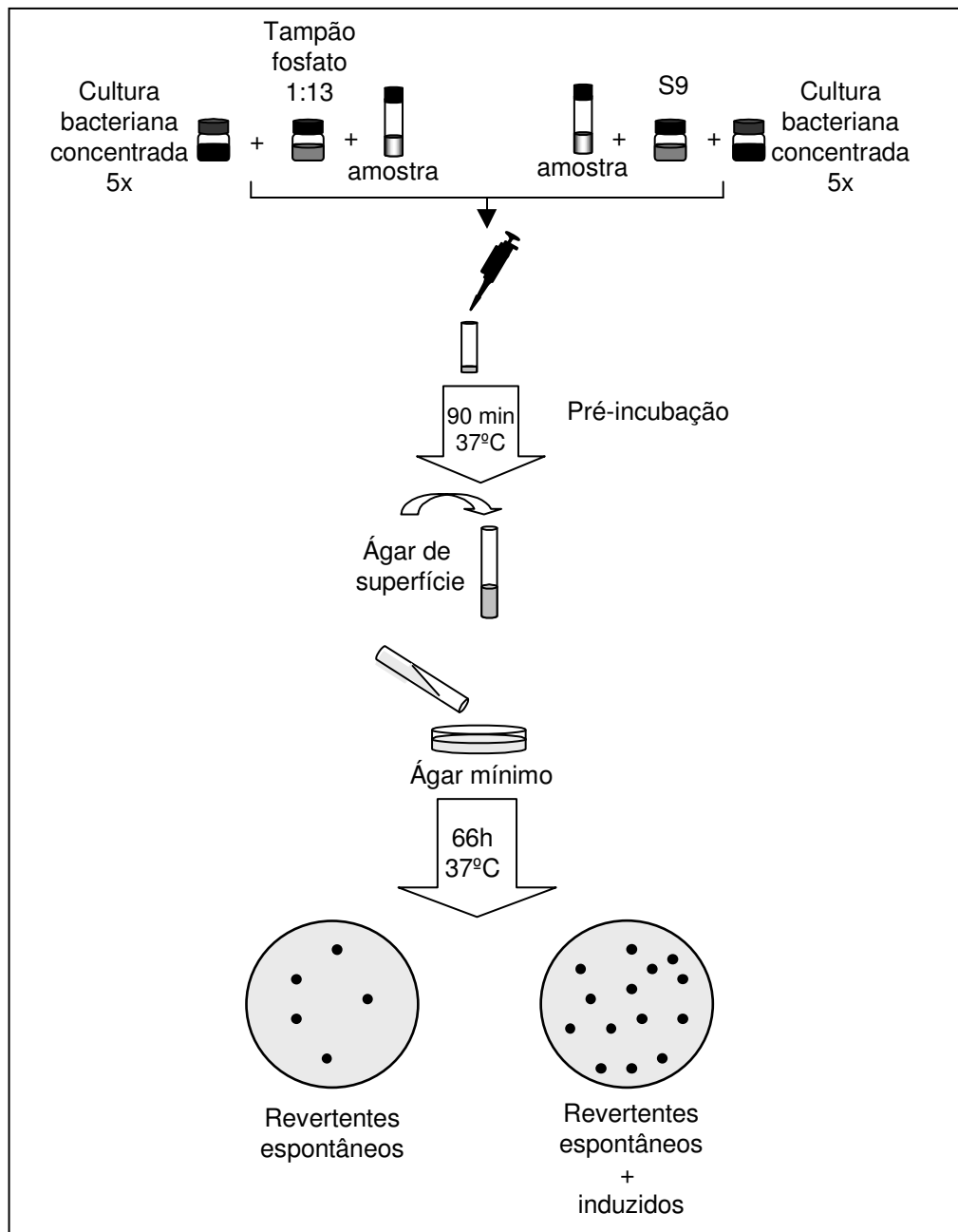


Figura 3. Esquema do teste de *Salmonella*/microsoma – método em microssuspensão (ROUBICEK, 2003)

Em todos os testes foi utilizado DMSO como controle negativo, em quintuplicata. PEREIRA e colaboradores (2004) em um estudo estatístico realizado com cerca de 800 ensaios em cinco anos definiu intervalos de aceitação das placas de controle negativo, num intervalo de confiança de

95%, para cada linhagem. As placas com reversão espontânea fora deste intervalo foram eliminadas. Em caso de eliminação de mais de 50% das placas dos controles negativos de cada linhagem o ensaio era invalidado. Os intervalos de validação para cada linhagem estão na **Tabela 2**.

Em todos os ensaios a capacidade de detecção das linhagens foi testada com controles positivos listados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Controles positivos e suas concentrações utilizadas na avaliação das amostras deste trabalho

Linhagem	Ativação metabólica	Substância ($\mu\text{g/placa}$)
TA98	-S9	4-nitroquinolina-1-óxido (0,125)
	+S9	2-aminoantraceno (0,625)
TA100	-S9	4-nitroquinolina-1-óxido (0,125)
	+S9	2-aminoantraceno (0,625)
YG1041	-S9	4-nitro-o-fenilene-diamina (2,5)
	+S9	2-aminoantraceno (0,03125)
YG1042	-S9	2-nitrofluoreno (5,0)
	+S9	2-aminoantraceno (0,625)

A cada ensaio foi também determinada a viabilidade de cada cultura utilizada no dia. Para tanto, cada cultura foi diluída $10^{-8}x$ e $100\mu\text{L}$ foram inoculados em placa de ágar nutriente. A contagem das colônias, após incubação de 66h deveria estar acima de 50.

3.2.4.4. Interpretação de resultados e análises estatísticas

A taxa de reversão espontânea de cada linhagem, obtida nas condições do ensaio, é a média do número de revertentes no controle negativo. Ao tratar as culturas destas linhagens com doses crescentes de um agente ou mistura de compostos com atividade mutagênica, o número de revertentes por placa aumenta, proporcionalmente ao aumento das doses de exposição, até um declínio na reversão, aonde as doses aplicadas são letais para as células por causarem excesso de danos ao DNA ou pela ação de outros compostos tóxicos presentes na amostra (BERNSTEIN *et al.*, 1982). A **Figura 4** apresenta a curva dose-resposta típica de um mutágeno, sendo x o número de revertentes e y a dose,

onde é possível ver que existe uma região onde a relação dose-resposta é linear.

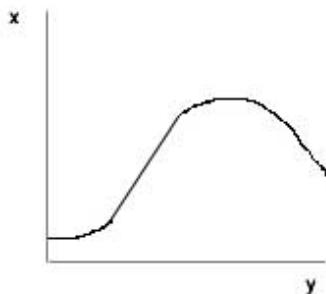


Figura 4. Típica curva dose-resposta de uma amostra mutagênica

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para verificação de diferenças estatísticas entre o controle negativo e as doses aplicadas, seguida de regressão linear. A potência da atividade mutagênica da amostra foi expressa pela inclinação da parte linear da curva dose-resposta. Diferenças significativas entre doses testadas e o controle negativo, e relação dose-resposta comprovadas estatisticamente indicam atividade genotóxica da amostra.

A razão de mutagenicidade (RM) foi calculada para cada dose analisada, sendo a razão entre a média do número de revertentes na dose teste (espontâneos e induzidos) e a média do número de revertentes no controle negativo (espontâneos).

Neste trabalho, os resultados foram expressos em número de revertentes por litro equivalente de água (que é a inclinação da parte linear da curva dose-resposta). O critério de positividade adotado foi o recomendado pela SBMCTA (UMBUZEIRO *et al.*, 2006), assim os resultados foram considerados positivos quando a RM foi maior ou igual a 2,0 e a ANOVA e a dose resposta foram significativas. Quando a ANOVA e dose resposta foram significativas, mas a RM foi menor do que 2,0, o ensaio foi repetido e quando a resposta manteve-se, o resultado foi considerado positivo. Quando não foi possível repetir o ensaio o resultado foi considerado como indícios de mutagenicidade. As outras respostas possíveis foram classificadas como resultados negativos.

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

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

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Atividade mutagênica dos corpos d'água avaliados

A **Tabela 4** mostra os resultados obtidos para o teste de Salmonella das amostras de água bruta nas captações das ETAs, com dose máxima testada de 50mL equivalentes/placa. Cada ponto foi avaliado uma vez e nos pontos que apresentaram resultados positivos ou indícios de mutagenicidade foram realizadas mais duas campanhas de coleta para verificar se havia repetição da resposta observada. Os dados brutos completos de todos os locais avaliados encontram-se no Anexo.

Tabela 4. Atividade mutagênica detectada nas amostras de água bruta com as linhagens TA98, TA100 e YG1042 na presença e ausência de S9 (em revertentes/L) com dose máxima de 50mL eq./placa

Local	Corpo D'água	Data Coleta	TA98		TA100		YG1042	
			-S9	+S9	-S9	-S9	-S9	+S9
ETA Itatiba	Rio Atibaia	Ago/04	ND	ND	NR	NR	ND	ND
ETA II Valinhos	Rio Atibaia	Ago/04	ND	ND	NR	NR	ND	i 990
		Jun/05	620	i 750	i 710	1100	ND	NR
		Jul/05	i 420	i 210	610	1000	ND	ND
ETA II Sumaré	Rio Atibaia	Ago/04	ND	ND	NR	NR	i 460	i 620
		Jun/05	1020	920	i 1400	2600	i 1020	NR
		Ago/05	370	ND	ND	1300	ND	850
ETA III Indaiatuba	Rib. Pirai	Set/04	ND	ND	NR	NR	ND	ND
ETA Artur Nogueira	Rep. Cotrins	Set/04	ND	ND	NR	NR	ND	ND
ETA Jundiaí	Rib. Jundiaí-Mirim	Jul/04	ND	ND	NR	NR	ND	ND

ND: Mutagenicidade não detectada nas condições do ensaio

i: Indícios de mutagenicidade

NR: Não realizado

Dos 6 locais avaliados, dois deles – Valinhos e Sumaré – apresentaram indícios de mutagenicidade na primeira coleta com a linhagem YG1042. Quando repetidas as coletas nestes locais, as amostras apresentaram resultados positivos com mais linhagens. Apresentaram resultados positivos ou indícios de mutagenicidade 6 amostras (60% do total de amostras), sendo 4 amostras com a linhagem TA98 (40% do total), 4 amostras (40%) com a TA100 e 4 amostras (40%) com a YG1042.

As amostras positivas apresentaram potências entre 370 a 1020 rev/L para a linhagem TA98, 610 a 2600 rev/L para a TA100 e apenas um resultado positivo de 850 rev/L para a YG1042.

As curvas de atividade mutagênica das amostras de água bruta com respostas classificadas como positivas ou indícios de mutagenicidade encontram-se nas **Figuras 5 a 7**.

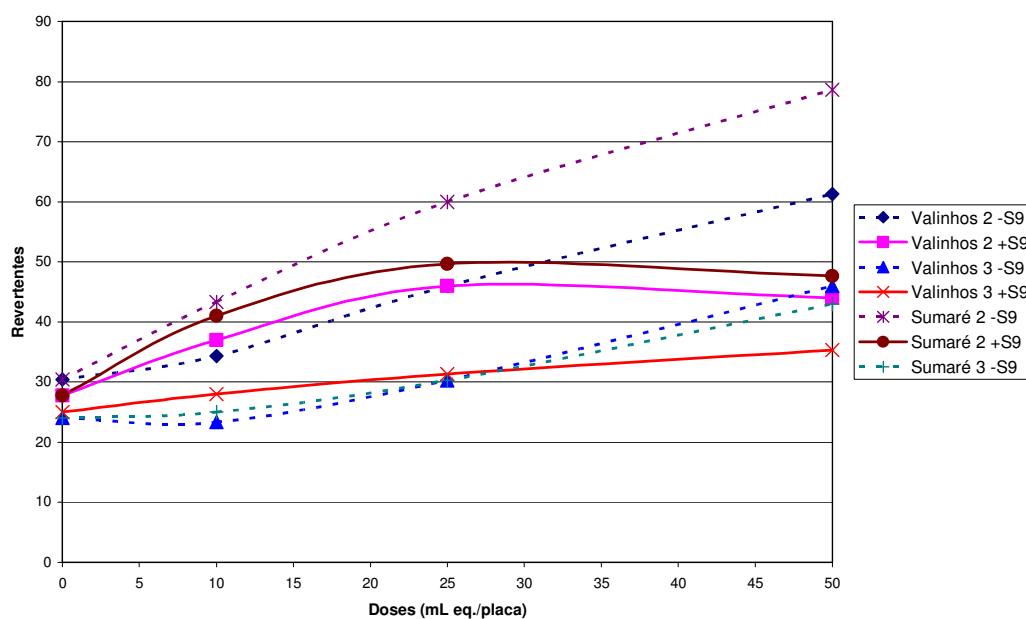


Figura 5. Curvas de atividade mutagênica detectada nas amostras de água bruta com a linhagem TA98 na presença e ausência de S9

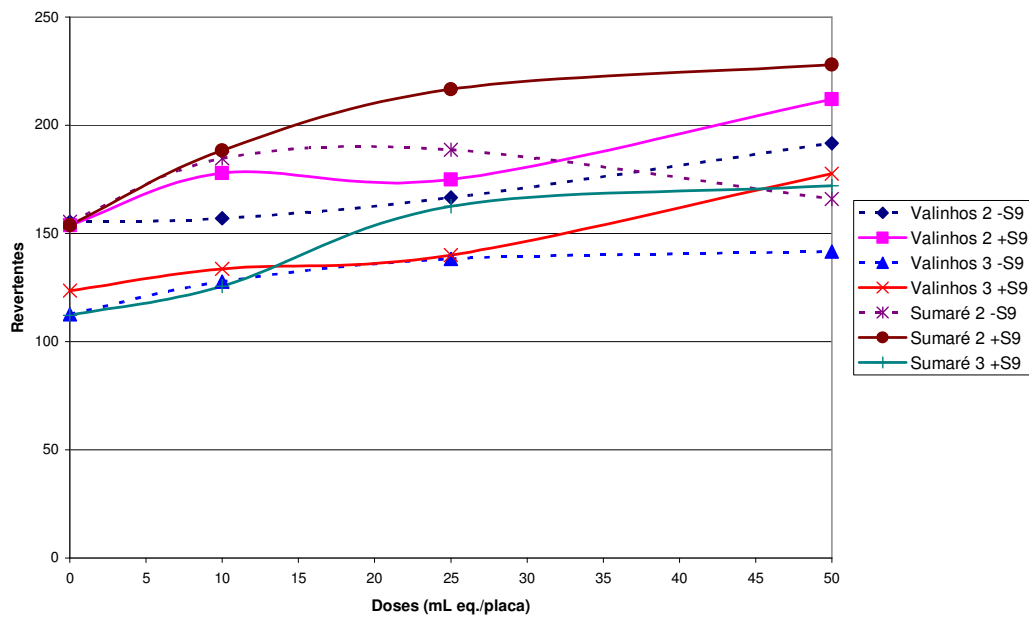


Figura 6. Curvas de atividade mutagênica detectada nas amostras de água bruta com a linhagem TA100 na presença e ausência de S9

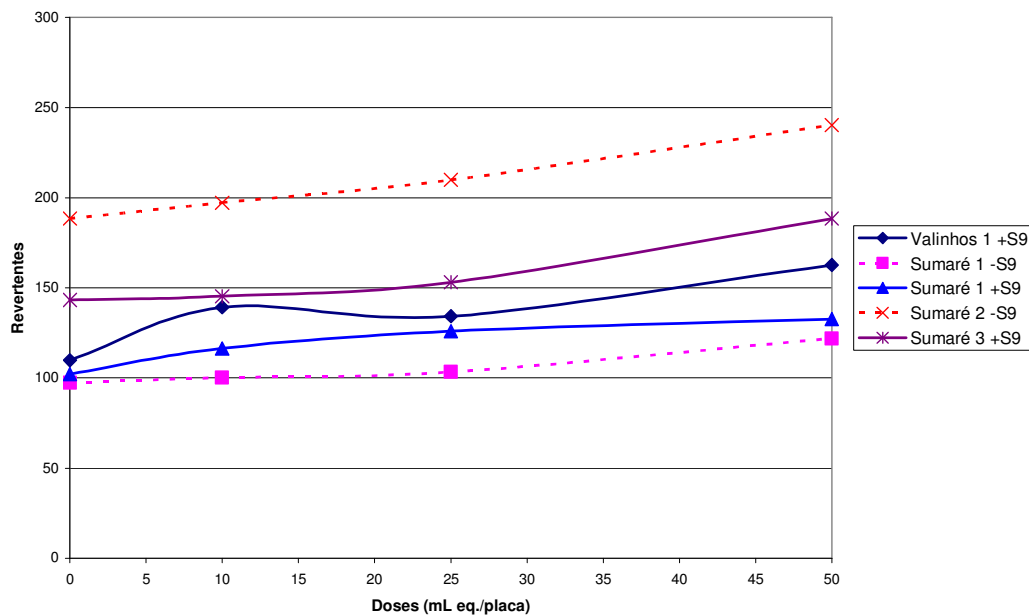


Figura 7. Curvas de atividade mutagênica detectada nas amostras de água bruta com a linhagem YG1042 na presença e ausência de S9

4.2. Investigação das fontes de atividade mutagênica

Em virtude das amostras do rio Atibaia nas captações de Valinhos e Sumaré apresentarem resultados positivos, foram coletadas amostras neste corpo d'água a montante destas captações no ponto a jusante da desembocadura do ribeirão Jacaré, que atravessa o centro da cidade de Itatiba e deságua no rio Atibaia após a captação de Itatiba e antes da captação de Valinhos. Os resultados deste ponto adicional estão na **Tabela 5**.

Tabela 5. Atividade mutagênica detectada nas amostras de água bruta no rio Atibaia a jusante do rib. Jacaré com as linhagens TA98, TA100 e YG1042 na presença e ausência de S9 (em revertentes/L) com dose máxima de 50mL eq./placa

Local	Corpo D'água	Data Coleta	TA98		TA100		YG1042	
			-S9	+S9	-S9	-S9	-S9	+S9
Rio Atibaia, jusante Rib. Jacaré	Rio Atibaia	Jun/05	630	490	NR	NR	ND	i 560
		Jul/05	590	ND	ND	ND	ND	ND

NR: Não realizado

ND: Mutagenicidade não detectada nas condições do ensaio

i: Indícios de mutagenicidade

As duas amostras coletadas neste ponto apresentaram resultados positivos com a linhagem TA98 com potências entre 490 e 630 rev/L e uma amostra apresentou indícios de mutagenicidade com a YG1042.

As curvas de atividade mutagênica das amostras de água bruta do rio Atibaia a jusante do rib. Jacaré com respostas classificadas como positivas ou indícios de mutagenicidade estão na **Figura 8**.

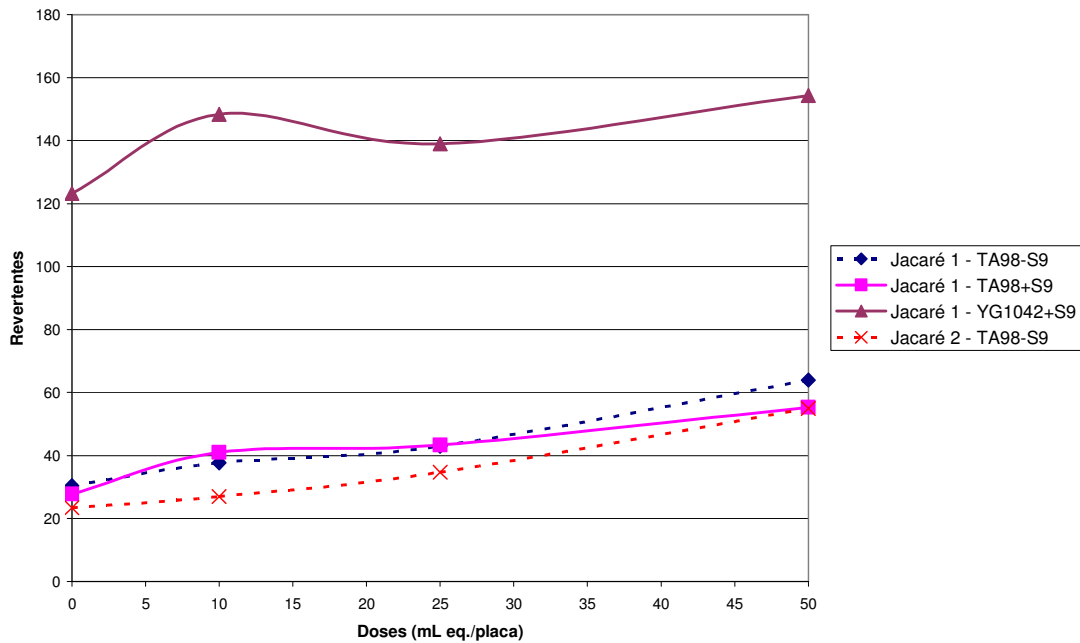


Figura 8. Curvas de atividade mutagênica detectada nas amostras do rio Atibaia a jusante do rib. Jacaré com as linhagens TA98 e YG1042 na presença e ausência de S9

4.3. Avaliação da utilização da linhagem YG1041 no monitoramento de águas superficiais

Com o objetivo de avaliar a utilização da linhagem YG1041 no monitoramento de águas superficiais, as amostras foram analisadas também utilizando-se esta linhagem. Os resultados da análise de todas as amostras com a linhagem YG1041 na presença e ausência de ativação metabólica estão na **Tabela 6**.

Tabela 6. Atividade mutagênica detectada nas amostras de água bruta com a linhagem YG1041 na presença e ausência de S9 (em revertentes/L) com dose máxima de 50mL eq./placa

Local	Corpo D'água	Data Coleta	YG1041	
			-S9	+S9
ETA Itatiba	Rio Atibaia	Ago/04	ND	ND
Rio Atibaia, jusante Rib. Jacaré	Rio Atibaia	Jul/05	3700	4100
ETA II Valinhos	Rio Atibaia	Ago/04	2700	3800
		Jul/05	4700	4300
ETA II Sumaré	Rio Atibaia	Ago/04	2500	6400
		Ago/05	6800	5600
ETA III Indaiatuba	Rib. Piraí	Set/04	i 1200	ND

ND: Mutagenicidade não detectada nas condições do ensaio

i: Índícios de mutagenicidade

Das 7 amostras analisadas, 6 apresentaram resultados positivos ou indícios de mutagenicidade (86% do total de amostras), com potências entre 2500 e 6800 rev/L para os resultados considerados positivos.

As curvas de atividade mutagênica das amostras com respostas classificadas como positivas ou indícios de mutagenicidade com a linhagem YG1041 encontram-se na **Figura 9**.

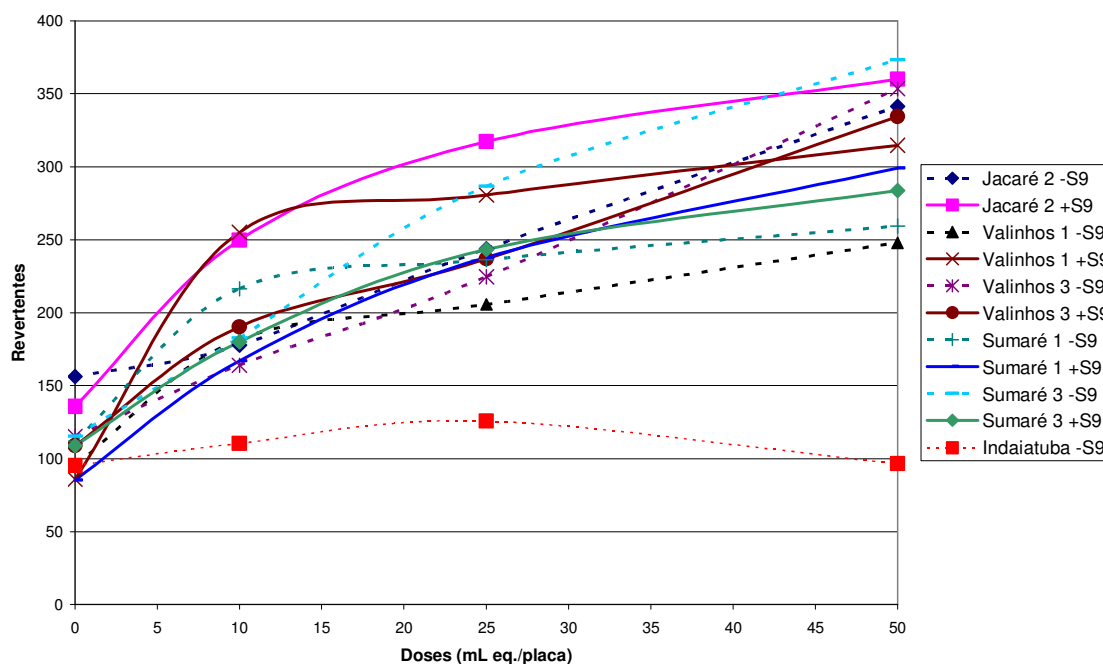


Figura 9. Curvas de atividade mutagênica detectada nas amostras com a linhagem YG1041 na presença e ausência de S9

Na **Figura 9**, nota-se que a curva apresentada pela amostra de Indaiatuba na ausência de S9 apresenta um perfil que difere dos demais. Apesar de estatisticamente significativo, o dado não apresenta relevância biológica, tratando-se de um resultado inconclusivo, assim como todos os indícios de mutagenicidade por definição.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. Atividade mutagênica dos corpos d'água avaliados

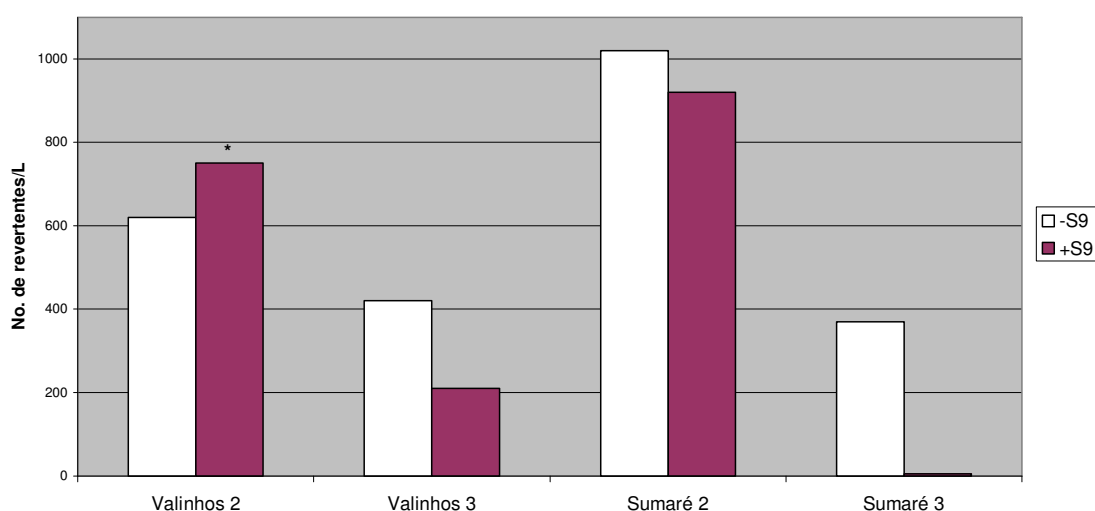
As amostras de água bruta das captações de Itatiba, Indaiatuba, Artur Nogueira e Jundiaí apresentaram resultados negativos.

Amostras do rio Atibaia apresentaram atividade mutagênica detectada em duas captações, Valinhos e Sumaré, locais onde houve, portanto, a extensão das campanhas de coleta para verificação da reincidência da mutagenicidade observada. O rio Atibaia abastece e recebe os despejos de diversas cidades, apresentando nítida piora da qualidade de suas águas no decorrer de seu percurso, piora também demonstrada pelos resultados de mutagenicidade e pelo monitoramento da CETESB (CETESB, 2006).

Todas as amostras destas duas captações apresentaram resultados positivos para o teste. Todas as linhagens responderam positivamente para alguma amostra destas captações, indicando que estas amostras continham mutágenos que provocam deslocamento no quadro de leitura, substituição de pares de base ou, em 4 amostras, ambos. Na captação de Valinhos, a atividade detectada atingiu 620 rev/L para a linhagem TA98 e 1100 rev/L para a TA100. Na captação de Sumaré, a atividade atingiu 1020 rev/L para a TA98 e 2600 rev/L para a TA100. A potência de 2600 rev/L é já considerada alta, enquanto todas as outras são moderadas, de acordo com a classificação de UMBUZEIRO e colaboradores (2001). Porém, como esta classificação foi idealizada para o teste de Ames (MARON & AMES, 1983) e não para sua variação mais sensível, em microssuspensão (KADO *et al.*, 1983), pode ser que esta classificação esteja superestimada.

A adição do sistema de metabolização *in vitro*, S9, provocou alteração da resposta em todas as amostras que apresentaram respostas positivas. Para a linhagem TA98 houve diminuição da mutagenicidade na presença de S9, como pode ser visto na **Figura 10**, indicando a predominância de mutágenos que são inativados pelo sistema de

metabolização dentre os mutágenos que causam deslocamento no quadro de leitura.



* Índícios de mutagenicidade

Figura 10. Comparação entre a presença e ausência de ativação metabólica para a linhagem TA98 para as amostras de água bruta com resultados positivos

Ao contrário, tanto para a linhagem TA100 quanto para a YG1042, uma variação da TA100, houve bioativação dos mutágenos pelo sistema de metabolização, conforme mostra a **Figura 11**. Estas respostas indicam a presença de mutágenos indiretos que causam substituição de pares de base.

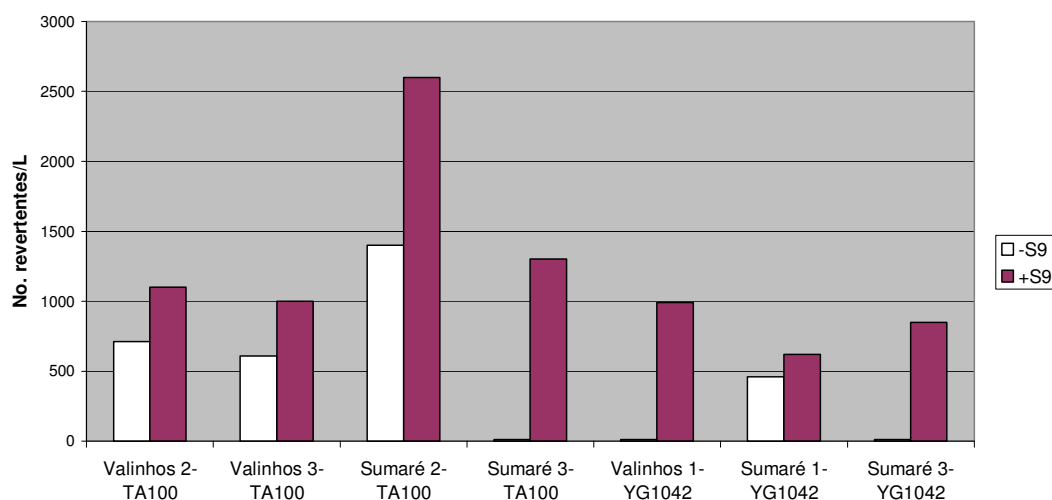


Figura 11. Comparação entre a presença e ausência de ativação metabólica para as linhagens TA100 e YG1042 para as amostras de água bruta com resultados positivos

5.2. Investigação das fontes de atividade mutagênica

Devido aos indícios de mutagenicidade detectados no rio Atibaia foi iniciada a investigação das possíveis fontes da atividade observada.

O ribeirão Jacaré atravessa o centro da cidade de Itatiba e recebe seus efluentes municipais sem tratamento e efluentes de diversas indústrias, inclusive algumas indústrias têxteis. O ribeirão é tributário do rio Atibaia e sua desembocadura localiza-se abaixo da captação de Itatiba. Foram coletadas duas amostras no rio Atibaia a jusante da desembocadura do ribeirão e ambas apresentaram respostas positivas para as linhagens TA98 e uma indícios de mutagenicidade com a YG1042. A atividade mutagênica apresentada para a linhagem TA98, de 630 rev/L é classificada como moderada, embora esta potência também possa estar superestimada.

A adição da ativação metabólica, S9, também provocou alteração da resposta em todas as amostras. Para a linhagem TA98 houve redução da mutagenicidade e para a linhagem YG1042, aumento da

mutagenicidade (**Figura 12**), traço comum às amostras coletadas neste trabalho no rio Atibaia.

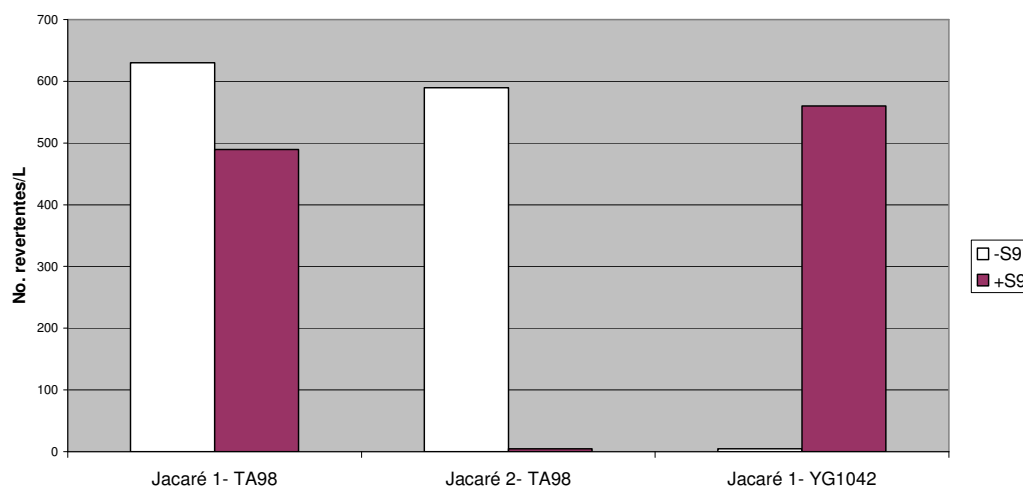


Figura 12. Comparação entre a presença e ausência de ativação metabólica para as linhagens TA98 e YG1042 para as amostras de água bruta do rio Atibaia a jusante do rib. Jacaré com resultados positivos

Os resultados positivos das duas amostras coletadas no rio Atibaia após a desembocadura do rib. Jacaré e o resultado negativo na captação de Itatiba, antes do ribeirão, sugerem que o rib. Jacaré contribui para a mutagenicidade observada no Rio Atibaia, impactando na captação de Valinhos. Os resultados alertam também para o fato de que, além dos efluentes domésticos ou industriais lançados diretamente no rio Atibaia, seus tributários importantes podem estar transportando poluentes para o rio.

Além do rib. Jacaré, o rio Atibaia tem pelo menos outros 2 tributários importantes, os ribeirões Pinheiros (classificado como classe 3 no CONAMA 357) e Anhumas (classe 4) (ESTADO DE SÃO PAULO, 1977; BRASIL, 2005), que deságuam no Atibaia entre as captações de Valinhos e Sumaré.

Não pode ser desconsiderada ainda a hipótese de contribuição de cargas difusas para a mutagenicidade observada, especialmente por tratar-se de área altamente urbanizada onde contaminantes presentes no ar ou no solo podem ser carregados para as águas superficiais.

5.3. Avaliação da utilização da linhagem YG1041 no monitoramento de águas superficiais

A linhagem YG1041 foi a mais sensível neste trabalho, respondendo positivamente a 86% das amostras testadas com esta linhagem. Como pode ser visto nas **Figuras 13 e 14**, nas amostras com resultados positivos ou indícios de mutagenicidade, a linhagem YG1041 responde de forma diferente da sua linhagem parental, a TA98, na ausência e presença de ativação metabólica.

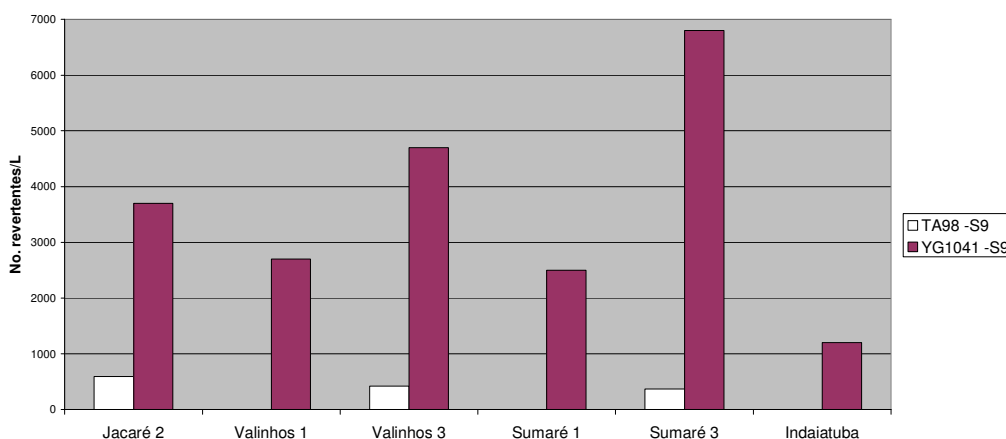


Figura 13. Comparação entre as linhagens TA98 e YG1041 na ausência de ativação metabólica para as amostras de água bruta com resultados positivos

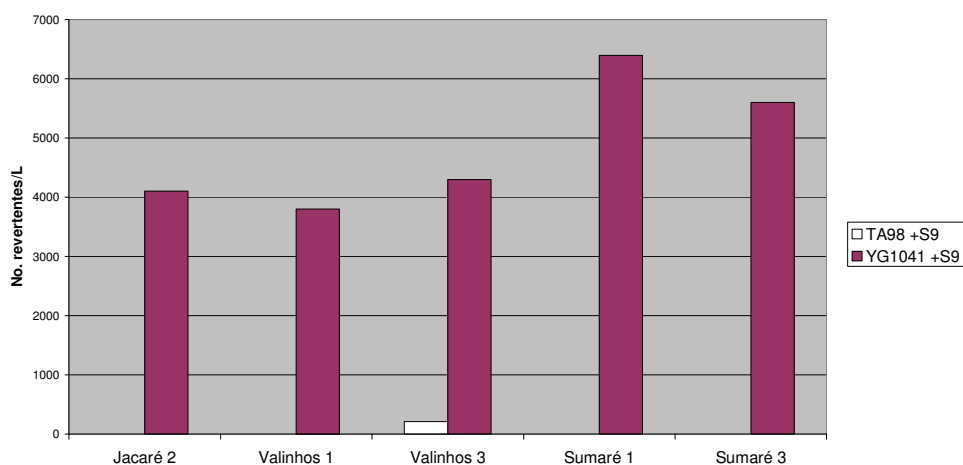


Figura 14. Comparação entre as linhagens TA98 e YG1041 na presença de ativação metabólica para as amostras de água bruta com resultados positivos

Comparando os resultados positivos observados com a YG1041 com os resultados da TA98, observa-se que a YG1041 sempre apresenta potências mais elevadas, em maior ou menor grau.

Os compostos detectados com mais sensibilidade pela YG1041 são aqueles que requerem bioativação pelas enzimas nitro-redutase e/ou acetiltransferase para que possam causar mutações de ponto, como as aminas aromáticas e nitrocompostos, uma vez que esta linhagem apresenta produção mais elevada destas enzimas. A YG1041 é uma linhagem tão sensível a esses compostos que chega a detectar nitrocompostos na ordem de picograma, como o 3-nitrobenzantrona, composto encontrado no ar e em águas pluviais (ENYA *et al.*, 1997; MURAHASHI *et al.*, 2003). Assim, o maior ou menor aumento da resposta mutagênica obtida com a YG1041 em relação à TA98 está relacionado ao tipo de metabolização sofrida por cada composto presente na amostra de água superficial, às concentrações destes compostos e suas potências. Por isso, a YG1041 – interpretada em conjunto com a TA98 – é uma

ferramenta muito interessante para a melhor compreensão das metabolizações que os compostos mutagênicos presentes na amostra estão sofrendo, podendo auxiliar no direcionamento de análises químicas subseqüentes.

No que se refere ao uso da linhagem YG1041 no monitoramento de águas superficiais, apesar da observação de respostas negativas com esta linhagem, devido à sua alta sensibilidade pode ser que haja detecção de compostos ubiqüitários em águas. Estes compostos podem ser gerados por atividades antrópicas, sendo carreados ou difundidos entre os diferentes compartimentos ambientais, conseqüentemente implicando na existência de valores basais para sua detecção pela linhagem em águas naturais ou tratadas.

Com o estabelecimento destes valores basais será possível a utilização desta linhagem para tomada de decisões no monitoramento ambiental, além do seu emprego na avaliação de fontes pontuais de poluição.

5.4. Avaliação de diferentes critérios de positividade

Todos os dados brutos deste trabalho foram interpretados diante de 3 critérios de positividade, além do critério recomendado pela SBMCTA (UMBUZEIRO *et al.*, 2006), para avaliação de outros critérios frente ao conjunto de dados aqui apresentado.

Os 3 critérios avaliados são o percentual 95% (CARNES *et al.*, 1985), percentual 95% com indícios de mutagenicidade e RM (razão de mutagenicidade) $\geq 1,7$ para linhagens de alta reversão espontânea, no caso, TA100, YG1041 e YG1042. O percentual 95% considera positivas as amostras que elevam a reversão acima de 95% da população do histórico do laboratório. Como este critério classifica as amostras apenas em positivas ou negativas, foi avaliada uma variação deste critério onde as amostras que não fossem classificadas como positivas pelo percentual 95%, mas que apresentaram ANOVA e dose-resposta significativas foram consideradas como indícios de mutagenicidade, independentemente da

ocorrência de repetição da análise.

CARIELLO & PIEGORSCH (1996) demonstraram que a utilização do $RM \geq 2$ pode ser um critério conservador demais para linhagens com reversão espontânea elevada. Assim, o último critério empregado foi uma variação do recomendado por SBMCTA (UMBUZEIRO *et al.*, 2006) onde, na análise com as linhagens TA100, YG1041 e YG1042, as amostras foram consideradas positivas com $RM \geq 1,7$ ao invés de 2, sem alteração no critério para a linhagem TA98. Em todos os casos, os resultados precisavam apresentar ANOVA e dose-resposta significativas (BERNSTEIN *et al.*, 1982) para então serem submetidos aos diferentes critérios. A **Figura 15** mostra como o número de resultados positivos e indícios de mutagenicidade oscilou com o emprego destes diferentes critérios no universo de 70 resultados deste trabalho.

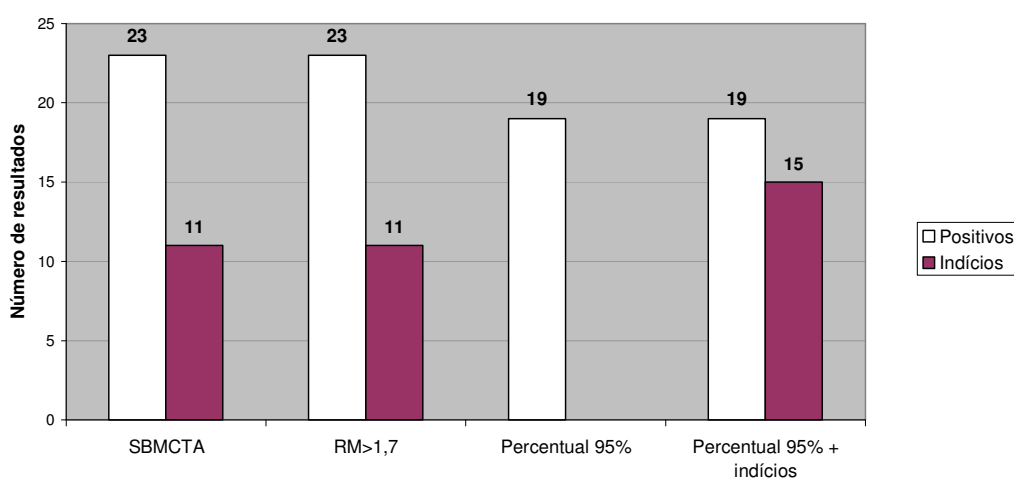


Figura 15. Comparação do número de resultados positivos e indícios de mutagenicidade frente aos diferentes critérios empregados

Nota-se que a redução do RM não alterou a classificação dos resultados, enquanto o percentual 95% mostrou-se um critério mais conservador, apesar da afirmação de que este levaria a mais resultados falsos positivos do que o critério $RM \geq 2$ (CARNES *et al.*, 1985).

Uma característica interessante do critério da SBMCTA é a determinação de que resultados classificados como indícios de mutagenicidade sejam repetidos e no caso da manutenção da resposta observada, o resultado seja considerado positivo. Dentre este conjunto de dados, 8 análises que geraram resultados classificados como indícios puderam ser repetidas e em todas o resultado repetiu-se, sendo então convertidos para resultados positivos.

Esta regra acaba gerando situações peculiares onde elevações relativamente pequenas na reversão tornam-se estatisticamente significativas e são classificadas como indícios de mutagenicidade. Com isso, um resultado pode ser classificado como positivo, no caso de repetição do indício, apenas pela sua significância estatística.

Outra desvantagem inerente à repetição da análise é a impossibilidade de se garantir a integridade da amostra no decorrer das diversas repetições. Recomenda-se a realização do teste no máximo em até 30 dias após a extração da amostra, prazo difícil de ser cumprido; ainda assim, mesmo dentro da validade, existe a possibilidade de haver instabilidade da amostra (ARAÚJO *et al.*, 2006).

No teste de Salmonella, a contagem dos revertentes apresenta variabilidade maior do que poderia ser modelado por métodos estatísticos convencionais (EDLER, 1992), assim os métodos estatísticos desenvolvidos para o teste podem tornar-se sensíveis demais em ensaios com contagens com pequeno desvio padrão. Se apenas a ANOVA e dose-resposta (BERNSTEIN *et al.*, 1982) tivessem sido empregados na análise destes resultados, todos os indícios de mutagenicidade seriam considerados resultados positivos. Portanto, embora a utilização de algum destes métodos seja imperativa, não devem ser o único critério de positividade empregado.

O critério empregado do percentual 95% com a classificação dos indícios de mutagenicidade não previa a repetição dos indícios. Se houvesse a conversão dos indícios de mutagenicidade em resultados positivos com a repetição, o critério resultaria em 24 resultados positivos e 10 indícios, praticamente o mesmo que o critério da SBMCTA. Assim,

nota-se que, mantendo a conversão dos indícios de mutagenicidade em resultados positivos, a utilização de diferentes critérios de positividade não exerce grande influência na classificação dos resultados, ao menos no pequeno conjunto de dados deste trabalho.

Significância estatística não é o mesmo que significância biológica. A estatística deve servir de guia para a interpretação dos resultados, mas, independentemente de qual o critério empregado, pode levar a resultados incoerentes como o apontado na **Figura 9**, por tratar-se de um teste onde o n é pequeno (3 placas) e especialmente pelos fenômenos biológicos envolvidos serem mais complexos do que os métodos empregados na sua interpretação (CARIELLO & PIEGORSCH, 1996).

5.5. Avaliação do aumento da dose máxima testada

Apesar da SBMCTA preconizar o emprego de dose máxima de 50mL na análise de águas brutas por meio do teste de Kado com extração em resina XAD (UMBUZEIRO *et al.*, 2006), todas as análises deste trabalho foram realizadas com dose máxima de 100mL equivalentes/placa, para avaliação do efeito do aumento da dose máxima e para permitir a comparação dos resultados com os dados do monitoramento da CETESB, realizados com dose máxima de 100mL até 2005 (CETESB, 2006).

O aumento da dose máxima testada elevou o número de resultados positivos e indícios de mutagenicidade, interpretados de acordo com SBMCTA (UMBUZEIRO *et al.*, 2006), indicando aumento na sensibilidade do ensaio (**Figura 16**).

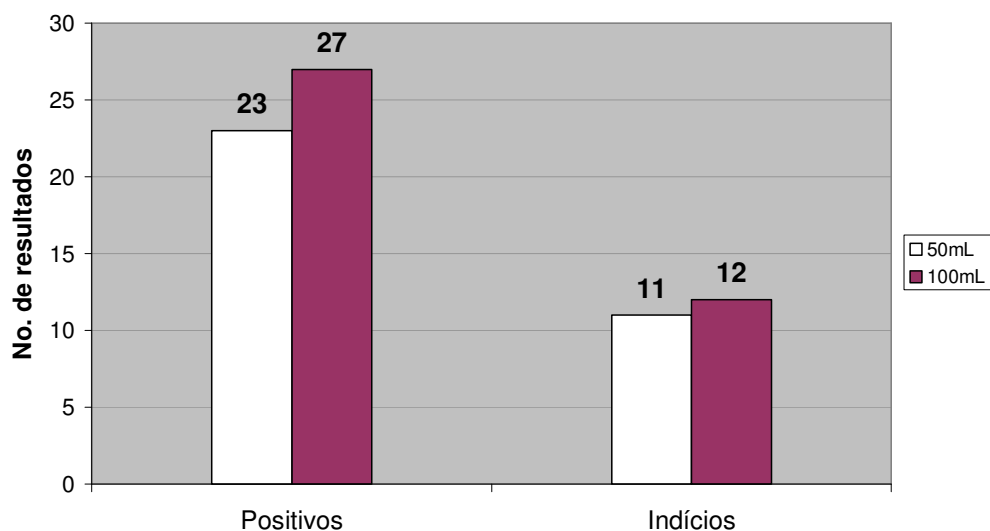


Figura 16. Comparação entre o número de resultados positivos e indícios de mutagenicidade observados com diferentes doses máximas testadas

A comparação das potências da atividade mutagênica observada nas amostras analisadas (exceto as com resultado negativo) para cada diferente dose máxima encontra-se na **Figura 17**.

Embora o acréscimo de um ponto não altere a inclinação da reta (que é a potência da amostra), foi observado que em 42,5% dos resultados houve diminuição da potência detectada com a adição da dose de 100mL em relação à potência até a dose de 50mL.

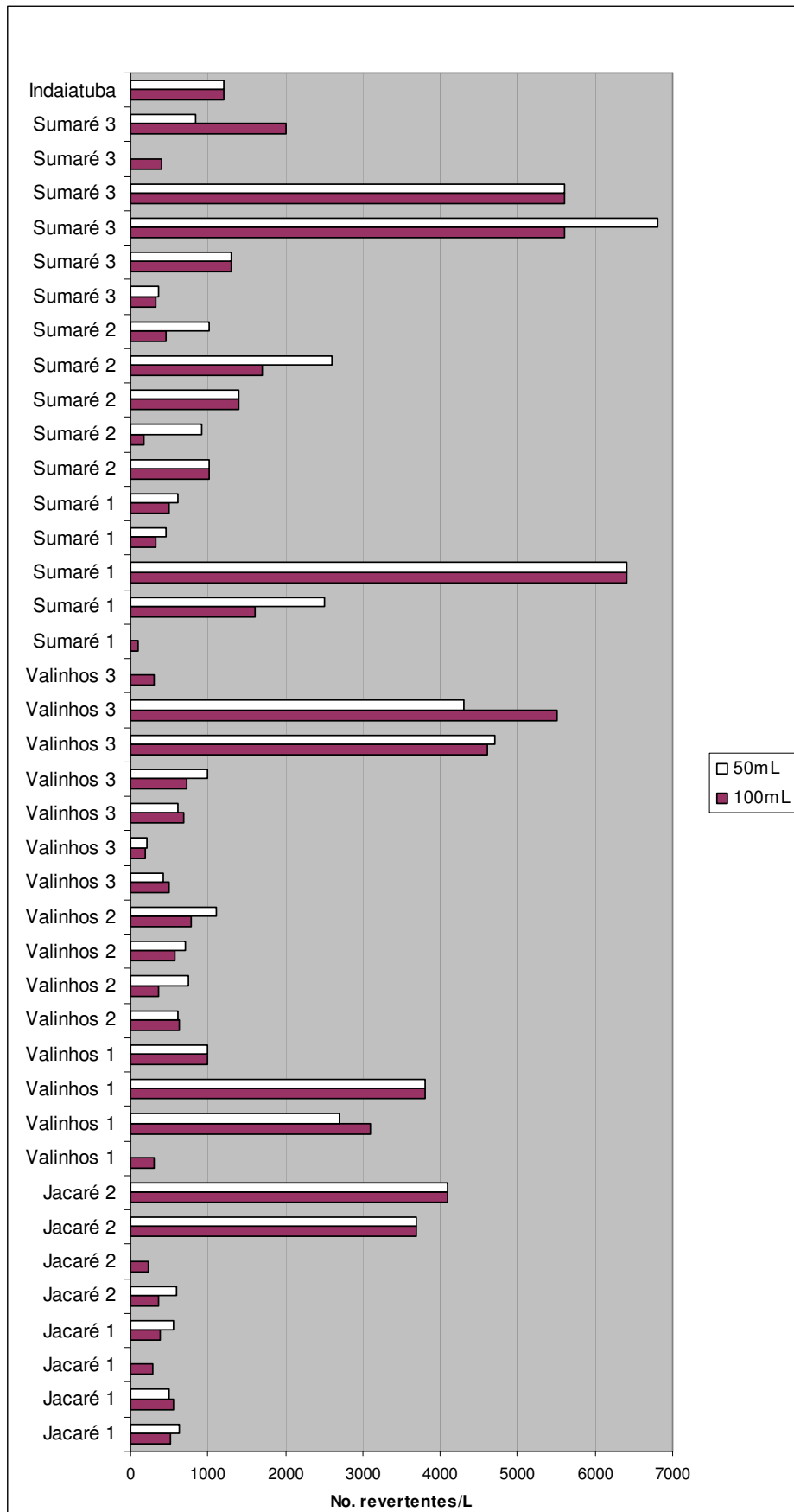


Figura 17. Comparação entre as potências da mutagenicidade observada para cada dose máxima testada

Após a porção linear da curva dose-resposta existe um plateau, no qual os efeitos tóxicos da amostra misturam-se à indução de mutação nas células, até chegar a um declínio na curva onde a toxicidade predomina. A truncagem tipo Bernstein (BERNSTEIN *et al.*, 1982), empregada na análise estatística, elimina as doses tóxicas para a avaliação da porção linear da curva, mas não necessariamente pontos deste plateau. A redução da potência com uma dose mais elevada poderia ser verificada com o acréscimo de um ponto deste plateau, subestimando a potência da atividade mutagênica.

Outra desvantagem do emprego da dose máxima de 100mL para águas brutas é a maior quantidade de amostra utilizada, o que exige a coleta de um volume maior de amostra e por vezes inviabiliza a repetição das análises.

5.6. Relevância ambiental dos dados

No ano de 2003, 34 pontos foram avaliados por meio do teste de Salmonella na rede de monitoramento de águas interiores da CETESB. Durante este ano apenas um ponto, ribeirão dos Cristais, teve amostras com resultados positivos para as linhagens TA98 e YG1042. De um total de 128 amostras testadas neste período, 4 amostras (3%) apresentaram positividade para o ensaio. As potências destas amostras atingiram 370 rev/L para a linhagem TA98 e 1000 rev/L para a YG1042 (CETESB, 2004).

No ano seguinte, 2004, os pontos avaliados caíram para 5, contemplando apenas os pontos mais críticos. Destes, 3 pontos (ribeirão dos Cristais, reservatório do Rio Grande e rio Cotia) apresentaram amostras com resultados positivos. Das 26 amostras analisadas, 5 (19%) apresentaram positividade para o ensaio. As potências destas amostras atingiram 160 rev/L para a linhagem TA98 e 990 rev/L para a YG1042 (CETESB, 2005).

Em 2005, os mesmos 5 pontos continuaram a ser monitorados, porém com a linhagem TA100 no lugar da YG1042. Todos os pontos apresentaram amostras positivas, com 48% de amostras positivas para o ensaio, atingindo potências de 900 rev/L para a linhagem TA98 e 1400 rev/L para a TA100 (CETESB, 2006).

As captações de Valinhos e Sumaré, avaliadas neste trabalho, apresentaram resultados positivos ou indícios em todas as 6 amostras coletadas, com potências máximas de 1020 rev/L para a TA98 e 1700 rev/L para a TA100.

Os dados obtidos neste trabalho, comparados com os dados da CETESB destes 3 anos, justificaram a avaliação mais abrangente das captações de Valinhos e Sumaré, que a partir de 2006 serão avaliadas também por meio do teste de Salmonella/microsoma no monitoramento (CETESB, 2006).

A avaliação do sedimento no rio Atibaia (ponto ATIB02605) indicou positividade para o teste de Salmonella (500 rev/g com TA98-S9), presença de metais (cromo, mercúrio, níquel, zinco e cobre) e, embora pequena, de HPAs. A positividade no teste de Salmonella poderia ser reflexo da presença destes HPAs ou de outros compostos orgânicos não investigados (CETESB, 2006). Este resultado está de acordo com os aqui apresentados, uma vez que o ponto ATIB02605 localiza-se no complexo petroquímico de Paulínia, antes da captação de Sumaré, sob influência deste ponto.

O monitoramento realizado pela CETESB com o uso de diferentes parâmetros, escolhidos em função do nível de impacto ambiental sofrido por cada corpo d'água, mostra que a maioria dos pontos abordados aqui sofre o impacto de lançamentos de efluentes domésticos, evidenciado pelos altos níveis de coliformes termotolerantes (Itatiba, Valinhos e Sumaré) e de fósforo total (embora este possa também ser oriundo de efluentes industriais específicos e drenagem de áreas agrícolas), elevado em todos os pontos onde o parâmetro é determinado. A captação de Sumaré ainda apresentou níveis não conformes de DBO, OD e nitrogênio

amoniacoal, que também podem estar relacionados com efluentes domésticos (CETESB, 2006).

A qualidade do rio Atibaia foi classificada como ruim em função dos níveis de alumínio, cádmio, ferro e potencial de formação de THMs. O Atibaia, assim como outros rios da região, encontra-se em processo de eutrofização em função dos níveis elevados de fósforo, provavelmente de origem difusa (CETESB, 2006).

A mutagenicidade detectada nas captações do rio Atibaia indica que, além dos problemas já conhecidos da bacia, existe a presença de outros compostos tóxicos não determinados no monitoramento, possivelmente de origem difusa.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dos seis locais avaliados, as captações de Sumaré e Valinhos apresentaram atividade mutagênica moderada detectada. A comparação destes resultados com os dos locais já avaliados pela CETESB justificou a inclusão destas captações entre os pontos avaliados pela CETESB por meio do teste de Salmonella a partir de 2006.

A avaliação inicial de fontes da mutagenicidade observada nestas captações indica que o ribeirão Jacaré é uma fonte, mas que existem outras, possivelmente difusas.

Em função de sua alta sensibilidade a nitro-compostos, a linhagem YG1041 pode ser empregada em estudos específicos, ajudando a direcionar análises químicas subseqüentes. Seu emprego na rotina do monitoramento, entretanto, não é recomendado pois existe a possibilidade da detecção de compostos ubiqüitários em águas.

Não houve diferença expressiva entre os diversos critérios de positividade empregados, indicando que o critério recomendado pela SBMCTA é bastante adequado para o conjunto de dados deste trabalho.

Apesar do aumento de sensibilidade, a realização dos ensaios com dose máxima de 100mL equivalentes/placa pode subestimar a potência das amostras, indicando que a dose de 50mL eq./placa foi a mais adequada para a avaliação de águas brutas neste trabalho.

6.1. Recomendações

Considerando-se a importância e complexidade da bacia, que compreende uma região de intensa concentração populacional e industrial, é fundamental investigar e caracterizar as fontes da mutagenicidade observada para que futuras ações de controle possam ser tomadas.

É importante ainda a geração de mais dados para o estabelecimento de valores basais para a linhagem YG1041 e melhor avaliação de critérios de positividade para o ensaio de Salmonella/microssoma.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMES, B.N., DURSTON, W.E., YAMASAKI, E., LEE, F.D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 70, 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.**, 31, 347-364, 1975.

APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed., **American Public Health Association, Washington, DC**, 1998.

ARAÚJO, R.P.A., BOTTA-PASCHOAL, C.M.R., SILVÉRIO, P.F., ALMEIDA, F.V., RODRIGUES, P.F., UMBUZEIRO, G.A., JARDIM, W.F., MOZETO, A.A. Application of toxicity identification evaluation to sediment in a highly contaminated water reservoir in southeastern Brazil, **Environ. Toxicol. Chem.**, 25, 581-588, 2006.

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

BRASIL, Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos d'água, as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 18 de março de 2005.

- BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os padrões de potabilidade. **Diário Oficial da União**, 26 de março de 2004.
- CANTOR, K.T. Drinking water and cancer. **Cancer Causes Control**, 8, 292-308, 1997.
- CARIELLO, N.F., PIEGORSCH, W.W. The Ames test: The two-fold rule revisited. **Mutat. Res.**, 369, 23-31, 1996.
- CARNES, B.A., DORNFELD, S.S., PEAK, M.J. A quantitative comparison of a percentile rule with a 2-fold rule for assessing mutagenicity in the Ames test. **Mutat. Res.**, 147, 15-21, 1985.
- CERNÁ, M., PASTORKOVÁ, A., SMID, J., BAVOROVÁ, H., OCADLÍKOVÁ, D., RÖSSNER, P., ZAVADIL, J. Genotoxicity of industrial effluents, river waters, and their fractions using the Ames test and in vitro cytogenetic assay. **Toxicol. Lett.**, 88, 191-197, 1996.
- CETESB, São Paulo. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo 2003**. Série relatórios CETESB, 2004.
- CETESB, São Paulo. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo 2004**. Série relatórios CETESB, 2005.
- CETESB, São Paulo. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo 2005**. Série relatórios CETESB, 2006.
- CETESB. Teste de Kado – ensaio de microssuspensão com *Salmonella typhimurium*. **Norma Técnica L5-241**, 1991.

- CHU, K.C., PATEL, K.M., LIN, A.H., TARONE, R.E., LINHART, M.S., DUNKEL, V.C. Evaluating statistical analyses and reproducibility of microbial mutagenicity assays. **Mutat. Res.**, 85, 119-132, 1981.
- CLAXTON, L.D., ALLEN, J., AULETTA, A., MORTELMANS, K., NESTMAN, E., ZEIGER, E. Guide for the Salmonella typhimurium/mammalian microsome test for bacterial mutagenicity. **Mutat. Res.**, 189, 83-91, 1987.
- CLAXTON, L.D., CREASON, J., NADER, J.A., POTEAT, W., ORR, J.D. GeneTox manager for bacterial mutagenicity assays: a personal computer and mini computer system. **Mutat. Res.**, 342, 87-94, 1995.
- CLAXTON, L.D., HOUK, V.S., HUGHES, T.J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutat. Res.**, 410, 237-243, 1998.
- DEARFIELD, K.L., CIMINO, M.C., MCCARROLL, N.E., MAUER, I., VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy, **Mutat. Res.**, 521, 121-135, 2002.
- DRESSLER, M. Extraction of trace amounts of organic compounds from water with porous organic polymers. **J. Chromatogr.**, 165, 167-206, 1979.
- EDLER, L. Statistical methods for short-term tests in genetic toxicology: The first fifteen years. **Mutat. Res.**, 277, 11-33, 1992.
- EGOROV, A.I., TERESCHENKO, A.A., ALTSHUL, L.M., VARTIAINEN, T., SAMSONOV, D., LABRECQUE, B., MÄKI-PAKKANEN, J., DRIZHD, N.L., FORD, T.E. Exposures to drinking water chlorination by-products in a Russian city. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, 206, 539-551, 2003.

- ENYA, T., SUZUKI, H., WATANABE, T., HIRAYAMA, T., HISAMATSU, Y. 3-Nitrobenzanthrone, a powerful bacterial mutagen and suspected human carcinogen found in diesel exhaust and airborne particulates. **Environ. Sci. Technol.**, 31, 2772-2776, 1997.
- GALASSI, S., GUZZELLA, L., MINGAZZINI, M., VIGANO, L., CARPI, S., SORA, S. Toxicological and chemical characterization of organic micropollutants in River Po waters (Italy). **Water Res.** 26, 19-27, 1992.
- GUZZELLA, L., SORA, S. Mutagenic activity of lake water sample used as drinking water resources in northern Italy. **Water Res.**, 32, 1733-1742, 1998.
- HAGIWARA, Y., WATANABE, M., ODA, Y., SOFUNI, T., NOHMI, T. Specificity and sensibility of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. **Mutat. Res.** 291, 171-180, 1993.
- HELMA, C., MERSCH-SUNDERMANN, V., HOUK, V.S., GLASBRENNER, U., KLEIN, C., WENQUING, L., KASSIE, F., SCHULTE-HERMANN, R., KNASMÜLLER, S. Comparative evaluation of four bacterial assays for the detection of genotoxic effects in the dissolved water phases of aqueous matrices. **Environ. Sci. Technol.** 30, 897-907, 1996.
- HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review. **Mutat. Res.**, 277, 91-138, 1992.
- HWANG, B.F., JAAKKOLA, J.J.K. Water chlorination and birth defects: a systematic review and meta-analysis. **Arch. Environ. Health**, 58, 83-91, 2003.
- JOLIBOIS, B., GUERBET, M. Evaluation of industrial, hospital and domestic wastewater genotoxicity with the Salmonella fluctuation test and the SOS chromotest. **Mutat. Res.**, 565, 151-162, 2005.

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

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

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

KIM, B.S., MARGOLIN, B.H. Statistical methods for the Ames Salmonella assay: a review. **Mutat. Res.**, 436, 113-122, 1999.

KOIVUSALO, M., PUKKALA, E., VARTIAINEN, T., JAAKKOLA, J.J.K., HAKULINEN, T. Drinking water chlorination and cancer – a historical cohort study in Finland. **Cancer Causes Control**, 8, 192-200, 1997.

KUMMROW, F., RECH, C.M., COIMBRAO, C.A., ROUBICECK, D.A., UMBUZEIRO, G.A. Comparison of the mutagenic activity of XAD4 and the blue rayon extracts of surface water and related drinking water samples. **Mutat. Res.**, 541, 103-113, 2003.

KUSAMRAN, W.S., WAKABAYASHI, K., OGURI, A., TEPSUWAN, A., NAGAO, M., SUGIMURA, T. Mutagenicities of Bangkok and Tokyo river water. **Mutat. Res.**, 325, 99-104, 1994.

LANGEVIN, R., RASMUSSEN, J.B., SLOTERDUK, H., BLAISE, C. Genotoxicity in water and sediment extracts from the St. Lawrence river system, using the SOS chromotest. **Water Res.**, 26, 419-429, 1992.

- LENDON, C.; ASHALL, F., GOATE, A. Exploring the etiology of Alzheimer's disease using molecular genetics. **J. Am. Med. Assoc.**, 277, 825-831, 1997.
- LEROUX, B.G., KREWSKI, D. Amesfit: a microcomputer program for fitting linear-exponential dose-response models in the Ames Salmonella assay. **Environ. Mol. Mutagen.**, 22, 78-84, 1993.
- LEVIN, D.E., HOLLSTEIN, M., CHRISTMAN, M.F., SCHWIERS, E.A., AMES, B.N. A new Salmonella tester strain (TA102) with A-T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 79, 7445-7449, 1982.
- MALLING, H.V. Dimethylnitrosamine: formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsomes. **Mutat. Res.**, 13, 425-429, 1971.
- MALLING, H.V. Incorporation of mammalian metabolism into mutagenicity testing. **Mutat. Res.**, 566, 183-189, 2004.
- MARGOLIN, B.H., KAPLAN, N., ZEIGER, E. Statistical analysis of the Ames Salmonella/microsome test. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 78, 3779-3783, 1981.
- MARON, D.M., AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutat. Res.**, 113, 173-215, 1983.
- McCANN, J., YAMASAKI, E., AMES, B.N. Detection of carcinogens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 72, 5135-5139, 1975.
- McCOY, E.C., ROSENKRANZ, H.S., MERMELSTEIN, R. Evidence for the existence of a family of bacterial nitroreductase capable of activating nitrated polycyclics to mutagens. **Environ. Mutagen.**, 3, 421-427, 1981.

MEIER, J.R. Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water. **Mutat. Res.**, 196, 211-245, 1988.

MEIER, J.R., BLAZAK, W.F., RICCIO, E.S., STEWART, B.E., BISHOP, D.F., CONDIE, L.W. Genotoxic properties of municipal wastewaters in Ohio. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 16, 671-680, 1987.

MONARCA, S., ZANI, C., RICHARDSON, S.D., THRUSTON JR, A.D., MORETTI, M., FERETTI, D., VILLARINI, M. A new approach to evaluating the toxicity and genotoxicity of disinfected drinking water. **Water Res.**, 38, 3809-3819, 2004.

MONARCA, S., PASQUINI, R., SFORZOLINI, G.S. Mutagenicity assessment of different drinking water supplies before and after treatments. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 34, 815-823, 1985.

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

MURAHASHI, T., IWANAGA, E., WATANABE, T., HIRAYAMA, T. Determination of the mutagen 3-nitrobenzanthrone in rainwater collected in Kyoto, Japan. **Journal of Health Science**, 49, 386-390, 2003.

OHE, T., WHITE, P.A., DeMARINI, D.M. Mutagenic characteristics of river waters flowing through large metropolitan areas in North America. **Mutat. Res.**, 534, 101-112, 2003.

OHE, T., WATANABE, T., WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutat Res.**, 567, 109-149, 2004.

PARK, J.H., LEE, B.J., LEE, S.K., KIM, K., LEE, K.H., CHE, J.H., KANG, K.S., LEE, Y.S. Genotoxicity of drinking water from three Korean cities. **Mutat. Res.**, 466, 173-178, 2000.

PELLIZZARI, E. D.; SHELDON, L. S.; BURSEY, J. T.; MICHAEL, L. C.; ZWEIDINGER, R. A. Master Analytical Scheme for Organic Compounds in Water, Chapter 9. **U.S.EPA**, 1984.

PEREIRA, C.A.B.; SINGER, J.M.; GENSE, J.C.R.F.; PEREZ, J.R.V. **Relatório de análise estatística sobre o projeto “desenvolvimento de software e análise estatística para teste de mutação reversa com Salmonella typhimurium (teste de Ames)”**. São Paulo: USP, 2004.

REHANA, Z., MALIK, A., AHMAD, M. Mutagenic activity of the ganges water with special reference to the pesticide pollution in the river between Kachla to Kannauj (UP), India. **Mutat Res.**, 343, 137-144, 1995.

REHANA, Z., MALIK, A., AHMAD, M. Genotoxicity of the Ganges water at Narora (U.P.), India. **Mutat. Res.**, 367, 187-193, 1996.

ROOK, J.J. Formation of haloforms during chlorination of natural waters. **J. Water Treat. Exam.**, 23, 234-243, 1974.

ROSENKRANZ, H.S., SPECK, W.T. Mutagenicity of metronidazole: activation by mammalian liver microsomes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 66, 520-525, 1975.

ROUBICEK, D.A. **Estratégias para avaliação da genotoxicidade de sedimentos**. São Paulo, 2003. 125p. Tese de Doutorado - Faculdade Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

SÃO PAULO (ESTADO), Decreto n° 8.468 de 8 de setembro de 1976, Dispõe sobre a prevenção e o controle do meio ambiente. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo, 9 de setembro de 1976.

SÃO PAULO (ESTADO), Decreto n° 10.755 de 22 de novembro de 1977, Dispõe sobre o enquadramento dos corpos de água receptores na

classificação prevista no Decreto n° 8.468/76. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo, 22 de novembro de 1977.

SÃO PAULO (ESTADO), Secretaria de Meio Ambiente, Resolução SMA n. 65. Cria o Índice de Qualidade de Água para fins de Abastecimento Público – IAP, São Paulo, 13 de agosto de 1998.

SCHENCK, K.M., WYMER, L.J., LYKINS, B.W. Jr, CLARK, R.M. Application of a Finnish mutagenicity model to drinking waters in the U.S.. **Chemosphere**, 37, 451-464, 1998.

SERRES de, F.J., SHELBY, M.D. Recommendations on data production and analysis using the Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutat. Res.**, 64, 159-165, 1979.

STEAD, A.G., HASSELBLAD, V., CREASON, J.P., CLAXTON, L.D. Modeling the Ames test. **Mutat. Res.**, 85, 13-27, 1981.

UMBUZEIRO, G.A.; VARGAS, V.M.F. Teste de Mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: Lúcia Ribeiro; Daisy Salvadori; Edmundo K. Marques. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas, 2003

UMBUZEIRO, G.A., ROUBICEK, D.A., SATO, M.I.Z., SANCHEZ, P.S. The *Salmonella* mutagenicity assay in a surface water quality monitoring program based on a 20-year survey, **Mutat. Res.**, 491, 119-126, 2001.

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** 54, 1589-1597, 2004.

- UMBUZEIRO, G.A., FREEMAN, H.S., WARREN, S.H., OLIVEIRA, D.P., TERAQ, Y., WATANABE, T., CLAXTON, L.D. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. **Chemosphere**, 60, 55-64, 2005.
- UMBUZEIRO, G.A., VARGAS, V.M.F., FELZENSZWALB, I., HENRIQUES, J.A.P., VARANDA, E. **Teste de mutação reversa com Salmonella typhimurium** - Série documentos - No. 01. - Disponível em <http://www.sbmcta.org.br/index.php?arg=doc01> Acessado em 29/06/06.
- U.S. EPA. **Guidelines establishing test procedures for the analysis of pollutants under the Clean Water Act**, Fed. Reg. 54 (231), 50216-50223, 1989.
- VAN LEEUWEN, F.X.R. Safe drinking water: the toxicologist's approach. **Food and Chemical Toxicology**, 38, 51-58, 2000.
- VARGAS, V.M.F., MOTTA, V.E.P., HENRIQUES, J.A.P. Analysis of mutagenicity of waters under the influence of petrochemical complexes by the Ames test (Salmonella/microsome). **Rev. Bras. Genet.**, 11, 505-518, 1988.
- VARTIAINEN, T., LIIMATAINEN, A. High levels of mutagenic activity in chlorinated drinking water in Finland. **Mutat. Res.**, 169, 29-34, 1986.
- WALLER, K., SWAN, S.H., DELORENZE, G., HOPKINS, B. Trihalomethanes in drinking water and spontaneous abortion. **Epidemiology**, 9, 134-140, 1998.
- WATANABE, M., ISHIDATE, M. Jr., NOHMI, T. A sensitive method for detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. **Mutat. Res.**, 216, 211-220, 1989.

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

WATANABE, T.; TAKAHASHI, Y.; TAKAHASHI, T.; NUKAYA, H.; TEARO, Y.; HIRAYAMA, T.; WAKABAYASHI, K. Seasonal fluctuation of the mutagenicity of river water in Fukui, Japan, and the contribution of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens. **Mutat. Res.**, 519, 187-197, 2002.

WATANABE, T., KUSAMRAN, W.R., ASANOMA, M., TEPSUWAN, A., TANTASRI, N., MEESIRIPAN, N., HASEI, T., MURAHASHI, T., HIRAYAMA, T., WAKABAYASHI, K. Mutagenicity of surface soils in urban areas of Aichi prefecture, Japan, and Bangkok, Thailand. **Journal of Health Science**, 51, 645-657, 2005.

WEINSTEIN, D., LEWINSON, T.M. A statistical treatment of the Ames mutagenicity assay. **Mutat. Res.**, 51, 433-434, 1978.

WHITE, P.A.; RASMUSSEN, J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutat. Res.**, 410, 223-236, 1998.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Guidelines for drinking-water quality**, Vol. 1: 3rd. Ed., 2004.

ZANI, C., FERETTI, D., BUSCHINI, A., POLI, P., ROSSI, C., GUZZELLA, L., DI CATERINO, F., MONARCA, S. Toxicity and genotoxicity of surface water before and after various potabilization steps. **Mutat. Res.**, 587, 26-37, 2005.

ZEIGER, E. History and rationale of genetic toxicity testing: An impersonal, and sometimes personal, view. **Environ. Mol. Mutagen.**, 44, 363-371, 2004.

ZEIGER, E., HASEMAN, J.K., SHELBY, M.D., MARGOLIN, B.H., TENNANT, R.W. Evaluation of four in vitro genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: confirmation of earlier results with 41 additional chemicals. **Environ. Mol. Mutagen.**, 16, 1-14, 1990.

8. ANEXO

8. ANEXOS

Dados brutos das análises realizadas

1. Ponto ATIB02030

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,cap. de Itatiba
Source/Batch/Lot: 13467
Exp. Date: 07/06/05
Strain: TA98-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	26	38	25 34	29 30.40
10.00	35	23	46	34.67
25.00	34	35	37	35.33
50.00	32	34	32	32.67
100.00	26	29	27	27.33
p	0.12	580p	510p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.392
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is 0.875

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,cap. de Itatiba
Exp. Date: 07/06/05
Strain: TA98+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	29	32	24 26	28 27.80
10.00	29	28	32	29.67
25.00	43	35	36	38.00
50.00	33	50	52	45.00
100.00	28	36	31	31.67
p	0.62	1300p	1280p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.006
Estimate of the slope is = 0.359724 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001

Resultado: Indícios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,cap. de Itatiba
Exp. Date: 07/06/05
Strain: TA100-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	159	155	153 152	158 155.40
10.00	155	161	173	163.00
25.00	191	182	180	184.33
50.00	121	198	181	166.67
100.00	118	107		112.50
p	0.12	1850p	1820p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.005
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is 0.137

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,cap. de Itatiba
Exp. Date: 07/06/05
Strain: TA100+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	160	161	157 141	150 153.80
10.00	187	170	174	177.00
25.00	206	211	230	215.67
50.00	210	180	198	196.00
100.00	139	142	158	146.33
p	0.62	1920p	2100p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,capt. de Itatiba
Source/Batch/Lot: 13467
Exp. Date: 31/05/05
Strain: YG1042-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	104	109	97 126	102 107.60
10.00	108	111	106	108.33
25.00	112	108	119	113.00
50.00	131	108	108	115.67
100.00	126	109	147	127.33
p	5.00	390p	340p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.272
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is 0.017

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,capt. de Itatiba
Exp. Date: 31/05/05
Strain: YG1042+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	116	118	113 132	137 123.20
10.00	107	119	144	123.33
25.00	115	144	129	129.33
50.00	128	130	113	123.67
100.00	120	144	129	131.00
p	0.62	2190p	2100p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.897
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is 0.236

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia,capt. ETA Itatiba
Source/Batch/Lot: 92817
Exp. Date: 14/09/04
Strain: TA98-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	26	24	32	27.33
10.00	20	23	25	22.67
25.00	25	26		25.50
50.00	22	24	21	22.33
p	0.12	452p	420p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.168
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is 0.925

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia,capt. ETA Itatiba
Exp. Date: 14/09/04
Strain: TA98+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	26	28	22 26	25.50
10.00	21	24	23	22.67
25.00	25	25	23	24.33
50.00	22	24	10	18.67
p	0.62	564p	724p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.242
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is 0.962

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia,capt. ETA Itatiba
Exp. Date: 14/09/04
Strain: YG1041-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean		
0.00	85	96	105	100	90	95.20
25.00	100	104	102			102.00
50.00	100	86	102			96.00
p	2.50	670p	670p			

P-value for ANOVA test of dose response is 0.463
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is 0.378

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia,capt. ETA Itatiba
Exp. Date: 14/09/04
Strain: YG1041+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean		
0.00	98	85	92	76	78	85.80
10.00	78	90	89			85.67
25.00	85	71	82			79.33
50.00	81	80	88			83.00
p	0.06	1095p	1030p			

P-value for ANOVA test of dose response is 0.655
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is 0.761

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia,capt. ETA Itatiba
Exp. Date: 14/09/04
Strain: YG1042-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean		
0.00	119	115	85	100	96	103.00
10.00	112	118	117			115.67
25.00	115	102	95			104.00
50.00	91	109	110			103.33
p	5.00	502p	500p			

P-value for ANOVA test of dose response is 0.500
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is 0.607

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia,capt. ETA Itatiba
Exp. Date: 14/09/04
Strain: YG1042+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean		
0.00	110	90	113	110	126	109.80
10.00	140	123	110			124.33
25.00	112	145	132			129.67
50.00	110	132	121			121.00
p	0.62	1710p	1470p			

P-value for ANOVA test of dose response is 0.267
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is 0.126

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, capt. de Itatiba
Source/Batch/Lot: 0509203
Exp. Date: 12/07/05
Strain: TA100-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean		
0.00	129	103	110	116	105	112.60
10.00	117	122	127			122.00
25.00	132	119	127			126.00
50.00	155	141	143			146.33
100.00	160	170	166			165.33
p	0.12	2180p	2240p			

P-value for ANOVA test of dose response < .001
Estimate of the slope is = 0.540132 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001
Resultado: Indícios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia,capt. de Itatiba
Source/Batch/Lot: 0509203
Exp. Date: 05/08/05
Strain: TA100

Code Dose	--	counts	--	Mean		
0.00	141	137	140	145	117	136.00
10.00	106	130	122			119.33
25.00	135	116	144			131.67
50.00	148	145	156			149.67
100.00	200	185	172			185.67
p	0.12	2000p	2020p			

P-value for ANOVA test of dose response < .001
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, capt. de Itatiba
Exp. Date: 12/07/05
Strain: TA100+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean		
0.00	123	142	120	131	102	123.60
10.00	140	128	123			130.33
25.00	140	138	146			141.33
50.00	149	147	157			151.00
100.00	151	161	161			157.67
p	0.62	2120p	2110p			

P-value for ANOVA test of dose response is 0.006
Estimate of the slope is = 0.356647 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001

Resultado: Indícios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia,capt. de Itatiba
Exp. Date: 05/08/05
Strain: TA100+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean		
0.00	142	135	144	142	129	138.40
10.00	126	149	127			134.00
25.00	139	126	164			143.00
50.00	160	165	183			169.33
100.00	169	193	187			183.00
p	0.62	1450p	2090p			

P-value for ANOVA test of dose response is 0.002
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia,capt. de Itatiba
Exp. Date: 05/08/05
Strain: YG1041-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean		
0.00	158	140	174	149	160	156.20
10.00	166	142	145			151.00
25.00	195	202	206			201.00
50.00	270	243	234			249.00
100.00	362	365	369			365.33
p	2.50	900p	840p			

P-value for ANOVA test of dose response < .001
Estimate of the slope is = 1.644107 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001

Resultado: Positivo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia,capt. de Itatiba
Exp. Date: 05/08/05
Strain: YG1041+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean		
0.00	140	136	125	120	157	135.60
10.00	137	150	143			143.33
25.00	158	143	180			160.33
50.00	161	183	174			172.67
100.00	205	241	219			221.67
p	0.62	1100p	1210p			

P-value for ANOVA test of dose response < .001
Estimate of the slope is = 0.839418 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001
Resultado: Indícios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia, capt.de Itatiba
 Source/Batch/Lot: 0509203
 Exp. Date: 26/08/05
 Strain: YG1041+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	81	74	82 84 92	82.60
10.00	101	92	79	90.67
25.00	110	112	87	103.00
50.00	136	136	124	132.00
100.00	157	181	168	168.67
p	0.06	1370p	1210p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
 Estimate of the slope is = 0.888103 .
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is < .001

Resultado: Positivo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, capt. de Itatiba
 Exp. Date: 12/07/05
 Strain: YG1042-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	124	120	107 125 122	119.60
10.00	112	125	98	111.67
25.00	135	119	123	125.67
50.00	135	117	116	122.67
100.00	127	125	137	129.67
p	5.00	590p	570p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.229
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.043

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, capt. de Itatiba
 Exp. Date: 12/07/05
 Strain: YG1042+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	127	133	145 132 127	132.80
10.00	111	137	148	132.00
25.00	153	138	141	144.00
50.00	131	138	140	136.33
100.00	157	137	151	148.33
p	0.62	1620p	1590p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.278
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.037

Resultado: Negativo

2. Ponto ATIB02035

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia, capt. Valinhos
 Source/Batch/Lot: 94314
 Exp. Date: 14/09/04
 Strain: TA98-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	26	24	32	27.33
10.00	26	25	22	24.33
25.00	30	28	41	33.00
50.00	37	40	31	36.00
100.00	37	71	68	58.67
p	0.12	452p	420p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.007
 Estimate of the slope is = 0.308556 .
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is < .001
 Resultado: Indícios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia, capt. Valinhos
 Exp. Date: 14/09/04
 Strain: TA98+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	26	28	22 26	25.50
25.00	24	31	31	28.67
50.00	26	35	40	33.67
100.00	31	32	25	29.33
p	0.62	564p	724p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.185
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.093
 Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia, capt. Valinhos
 Exp. Date: 14/09/04
 Strain: YG1041-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	85	96	105 100 90	95.20
10.00	189	154	202	181.67
25.00	216	207	194	205.67
50.00	270	272	202	248.00
100.00	432	434	435	433.67
p	2.50	670p	670p	

Unable to find acceptable linear model under
 Bernstein approach
 ANOVA 0.032
 Resultado: Positivo

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia, capt. Valinhos
 Exp. Date: 14/09/04
 Strain: YG1041+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	98	85	92 76 78	85.80
10.00	265	243	257	255.00
25.00	343	255	244	280.67
50.00	315	344	285	314.67
100.00	290	306	300	298.67
p	0.06	1095p	1030p	

Unable to find acceptable linear model under
 Bernstein approach
 ANOVA 0.002
 Resultado: Positivo

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia, capt. Valinhos Exp.
 Date: 14/09/04 Strain: YG1042-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	119	115	85 100 96	103.00
10.00	126	99	121	115.33
25.00	124	139	109	124.00
50.00	131	111	132	124.67
100.00	140	140		140.00
p	5.00	502p	500p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.062
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.004
 Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia, capt. Valinhos
 Exp. Date: 14/09/04
 Strain: YG1042+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	110	90	113 110 126	109.80
10.00	142	148	128	139.33
25.00	138	124	141	134.33
50.00	183	149	156	162.67
100.00	160	175	172	169.00
p	0.62	1710p		

P-value for ANOVA test of dose response < .001
 Estimate of the slope is = 0.991954 .
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is < .001
 Resultado: Indícios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia, cap Valinhos
 Source/Batch/Lot: 13469
 Exp. Date: 07/06/05
 Strain: TA98-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	26	38	25 34 29	30.40
10.00	25	38	40	34.33
25.00	52	44	42	46.00
50.00	59	72	53	61.33
100.00	112	95	76	94.33
p	0.12	580p	510p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
 Estimate of the slope is = 0.638640 .
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is < .001
 Resultado: Positivo

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia, cap Valinhos
 Exp. Date: 07/06/05
 Strain: TA98+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	29	32	24 26 28	27.80
10.00	35	43	33	37.00
25.00	37	52	49	46.00
50.00	46	44	42	44.00
100.00	59	64	72	65.00
p	0.62	1300p	1280p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
 Estimate of the slope is = 0.365939 .
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is < .001
 Resultado: Positivo

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,cap Valinhos
Exp. Date: 07/06/05
Strain: TA100-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	159	155	153 152	155.40
10.00	158	157	156	157.00
25.00	160	171	169	166.67
50.00	177	216	182	191.67
100.00	208	204	212	208.00
p	0.12	1850p	1820p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,cap Valinhos
Exp. Date: 07/06/05
Strain: TA100+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	160	161	157 141 150	153.80
10.00	168	185	181	178.00
25.00	172	161	192	175.00
50.00	216	194	226	212.00
100.00	226	225	236	229.00
p	0.62	1920p	2100p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
Estimate of the slope is = 0.772902 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001

Resultado: Indícios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,cap Valinhos
Exp. Date: 07/06/05
Strain: YG1042-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	166	222	182 198 174	188.40
10.00	173	224	235	210.67
25.00	208	204	208	206.67
50.00	217	202	212	210.33
100.00	250	242	252	248.00
p	5.00	340p	320p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.030
Estimate of the slope is = 0.520965 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is 0.002

Resultado: Indícios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, capt. de Valinhos
Source/Batch/Lot: 0509204
Exp. Date: 12/08/05
Strain: TA98-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	29	21	24 22	24.00
10.00	20	24	26	23.33
25.00	25	33	33	30.33
50.00	36	45	57	46.00
100.00	82	74	64	73.33
p	0.12	560p	620p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
Estimate of the slope is = 0.486444 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001

Resultado: Positivo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, capt. de Valinhos
Exp. Date: 12/08/05
Strain: TA98+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	24	24	27	25.00
10.00	27	29		28.00
25.00	30	34	30	31.33
50.00	32	43	31	35.33
100.00	36	49	48	44.33
p	0.62	740p	700p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.006
Estimate of the slope is = 0.191202 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001

Resultado: Indícios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, capt. de Valinhos
Source/Batch/Lot: 0509204
Exp. Date: 12/07/05
Strain: TA100-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	129	103	110 116 105	112.60
10.00	117	129	137	127.67
25.00	147	138	130	138.33
50.00	144	145	136	141.67
100.00	176	186	195	185.67
p	0.12	2180p	2240p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
Estimate of the slope is = 0.678150 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001

Resultado: Indícios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, capt. de Valinhos
Exp. Date: 12/08/05
Strain: TA100-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	132	158	135 126 127	135.60
10.00	161	126	165	150.67
25.00	114	157	141	137.33
50.00	179	179	191	183.00
100.00	167	216	201	194.67
p	0.12	2170p	2100p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.005
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, capt. de Valinhos
Exp. Date: 12/07/05
Strain: TA100+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	123	142	120 131 102	123.60
10.00	129	145	127	133.67
25.00	136	147	137	140.00
50.00	179	184	170	177.67
100.00	182	186	204	190.67
p	0.62	2120p	2110p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
Estimate of the slope is = 0.727376 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001

Resultado: Indícios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, capt. de Valinhos
Exp. Date: 12/08/05
Strain: TA100+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean		
0.00	125	146	137	122	135	133.00
10.00	131	162	160			151.00
25.00	174	147	160			160.33
50.00	165	177	200			180.67
100.00	165	170	201			178.67
p	0.62	2080p	2070p			

P-value for ANOVA test of dose response is 0.004
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, capt. de Valinhos
Exp. Date: 12/08/05
Strain: YG1041-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean		
0.00	105	116	136	110	109	115.20
10.00	154	183	155			164.00
25.00	217	203	254			224.67
50.00	378	362	320			353.33
100.00	560	560	590			570.00
p	2.50	910p	910p			

P-value for ANOVA test of dose response < .001
Estimate of the slope is = 4.589465 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001

Resultado: Positivo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, capt. de Valinhos
Exp. Date: 12/08/05
Strain: YG1041+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean		
0.00	107	99	104	127	107	108.80
10.00	176	195	200			190.33
25.00	235	220	256			237.00
50.00	348	325	330			334.33
100.00	445	473	416			444.67
p	0.06	1220p	1070p			

P-value for ANOVA test of dose response < .001
Estimate of the slope is = 5.496101 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001

Resultado: Positivo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, capt. de Valinhos
Exp. Date: 12/07/05
Strain: YG1042-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean		
0.00	124	120	107	125	122	119.60
10.00	142	110	138			130.00
25.00	120	144	127			130.33
50.00	136	121	144			133.67
100.00	142	146	160			149.33
p	5.00	590p	570p			

P-value for ANOVA test of dose response is 0.062
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is 0.003

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, capt. de Valinhos
Exp. Date: 12/07/05
Strain: YG1042+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean		
0.00	127	133	145	132	127	132.80
10.00	129	172	172			157.67
25.00	150	154	164			156.00
50.00	194	175	140			169.67
100.00	168	154	171			164.33
p	0.62	1620p	1590p			

P-value for ANOVA test of dose response is 0.036
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is 0.008

Resultado: Negativo

3. Ponto ATIB02800

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia, capt. ETA Sumare
 Source/Batch/Lot: 94359
 Exp. Date: 24/09/04
 Strain: TA98

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	34	37	36 29	34.00
10.00	30	34	31	31.67
25.00	38	36	38	37.33
50.00	27	22	32	27.00
p	0.12	454p	490p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.028
 P-value for the test of the positive dose response (slope at origin) is 0.985

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia, capt. ETA Sumare
 Exp. Date: 24/09/04
 Strain: TA98+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	32	31	27 27 26	28.60
10.00	26	32	28	28.67
25.00	31	32	28	30.33
50.00	28	29	29	28.67
p	0.62	1370p	1430p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.773
 P-value for the test of the positive dose response (slope at origin) is 0.413

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia, capt. ETA Sumare
 Exp. Date: 24/09/04
 Strain: YG1041-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	108	118	110 110 113	111.80
10.00	236	200	213	216.33
25.00	246	240	223	236.33
50.00	276	250	252	259.33
p	2.50	1290p	1074p	

Unable to find acceptable linear model under Bernstein approach
 ANOVA 0.000

Resultado: Positivo

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia, capt. ETA Sumare
 Exp. Date: 24/09/04
 Strain: YG1041+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	93	86	88 85 75	85.40
10.00	155	178	168	167.00
25.00	249	239	226	238.00
50.00	324	292	281	299.00
p	0.06	1140p	1130p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
 Estimate of the slope is = 6.438076 .
 P-value for the test of the positive dose response (slope at origin) is < .001

Resultado: Positivo

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia, capt. ETA Sumare
 Exp. Date: 24/09/04
 Strain: YG1042-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	99	99	108 86 95	97.40
10.00	100	107	94	100.33
25.00	103	116	91	103.33
50.00	127	124	115	122.00
p	5.00	630p		

P-value for ANOVA test of dose response is 0.027
 P-value for the test of the positive dose response (slope at origin) is 0.002

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia, capt. ETA Sumare
 Exp. Date: 24/09/04
 Strain: YG1042+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	100	118	109 89 95	102.20
10.00	116	108	125	116.33
25.00	135	131	112	126.00
50.00	134	136	128	132.67
100.00	148	151	162	153.67
p	0.62	1540p	1560p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.011
 Estimate of the slope is = 0.504893 .
 P-value for the test of the positive dose response (slope at origin) is < .001

Resultado: Indicios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia, cap. de Sumare
 Source/Batch/Lot: 13470
 Exp. Date: 07/06/05
 Strain: TA98-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	26	38	25 34 29	30.40
10.00	36	49	45	43.33
25.00	62	54	64	60.00
50.00	62	86	88	78.67
100.00	86	69	86	80.33
200.00	50	58	54	54.00
p	0.12	580p	510p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
 Estimate of the slope is = 1.015748 .
 P-value for the test of the positive dose response (slope at origin) is < .001

Resultado: Positivo

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia, cap. de Sumare
 Exp. Date: 07/06/05
 Strain: TA98+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	29	32	24 26 28	27.80
10.00	45	40	38	41.00
25.00	42	53	54	49.67
50.00	46	53	44	47.67
100.00	40	41	46	42.33
200.00	38	41	24	34.33
p	0.62	1300p	1280p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
 Estimate of the slope is = 0.919044 .
 P-value for the test of the positive dose response (slope at origin) is < .001

Resultado: Indicios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-R. Atibaia, capt. de Sumare
 Source/Batch/Lot: 13470
 Exp. Date: 14/06/05
 Strain: TA98+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	28	25	31 29	28.25
10.00	33	43	31	35.67
25.00	55	33	52	46.67
50.00	39	50	51	46.67
100.00	59	41	36	45.33

P-value for ANOVA test of dose response is 0.004
 Estimate of the slope is = 0.179453 .
 P-value for the test of the positive dose response (slope at origin) is 0.004

Resultado: Indicios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,cap. de Sumare
 Exp. Date: 07/06/05
 Strain: TA100-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean	
0.00	159	155	153	152 158	155.40
10.00	186	191	177		184.67
25.00	191	191	184		188.67
50.00	164	193	141		166.00
100.00	139	166	162		155.67
200.00	171	150	126		149.00
p	0.12	1850p	1820p		

P-value for ANOVA test of dose response is 0.027
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.166
 Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,cap. de Sumare
 Exp. Date: 07/06/05
 Strain: TA100+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean	
0.00	160	161	157	141 150	153.80
10.00	172	192	201		188.33
25.00	225	204	221		216.67
50.00	225	214	245		228.00
100.00	174	150	150		158.00
200.00	102	107	107		105.33
p	0.62	1920p	2100p		

P-value for ANOVA test of dose response < .001
 Estimate of the slope is = 1.580887 .
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is < .001
 Resultado: Indícios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia, capt. de Sumare
 Exp. Date: 14/06/05
 Strain: TA100+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean	
0.00	120	125	110	139 137	126.20
10.00	144	152	153		149.67
25.00	166	177	147		163.33
50.00	215	222	205		214.00
100.00	166	189	186		180.33
p	0.62	2140p	2050p		

P-value for ANOVA test of dose response < .001
 Estimate of the slope is = 1.687559 .
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is < .001
 Resultado: Indícios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,cap. de Sumare
 Exp. Date: 07/06/05
 Strain: YG1042-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean	
0.00	166	222	182	198 174	188.40
10.00	194	196	202		197.33
25.00	200	211	219		210.00
50.00	230	242	249		240.33
100.00	231	227	223		227.00
200.00	193	207	220		206.67
p	5.00	340p	320p		

P-value for ANOVA test of dose response is 0.005
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is < .001
 Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia,cap.de Sumare
 Source/Batch/Lot: 0509205
 Exp. Date: 12/08/05
 Strain: TA98

Code Dose	--	counts	--	Mean	
0.00	29	21	24	22	24.00
10.00	22	29	24		25.00
25.00	31	27	33		30.33
50.00	49	40	40		43.00
100.00	45	46	46		45.67
p	0.12	560p	620p		

P-value for ANOVA test of dose response < .001
 Estimate of the slope is = 0.248213 .
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is < .001
 Resultado: Indícios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia,cap.de Sumare
 Source/Batch/Lot: 0509205
 Exp. Date: 19/08/05
 Strain: TA98-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean	
0.00	21	21	22	21 34	23.80
10.00	40	32	28		33.33
25.00	32	40	37		36.33
50.00	45	51	38		44.67
100.00	59	53	50		54.00
p	0.12	670p	570p		

P-value for ANOVA test of dose response < .001
 Estimate of the slope is = 0.317310 .
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is < .001
 Resultado: Positivo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia,cap.de Sumare
 Exp. Date: 12/08/05
 Strain: TA98+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean	
0.00	24	24	27		25.00
10.00	25	23			24.00
25.00	24	24	26		24.67
50.00	34	33	32		33.00
100.00	29	31	51		37.00
p	0.62	740p	700p		

P-value for ANOVA test of dose response is 0.053
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.003
 Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia,cap.de Sumare
 Exp. Date: 12/08/05
 Strain: TA100

Code Dose	--	counts	--	Mean	
0.00	132	158	135	126 127	135.60
10.00	121	147	141		136.33
25.00	151	134	143		142.67
50.00	129	133			131.00
100.00	122	147			134.50
p	0.12	2170p	2100p		

P-value for ANOVA test of dose response is 0.871
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.613
 Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, cap.de Sumare
Exp. Date: 12/08/05
Strain: TA100+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	125	146	137 122 135	133.00
10.00	149	144	148	147.00
25.00	198	206	197	200.33
50.00	180	202	205	195.67
100.00	105	116	127	116.00
p	0.62	2080p	2070p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
Estimate of the slope is = 2.576049 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001
Resultado: Indicios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, cap.de Sumare
Exp. Date: 19/08/05
Strain: TA100+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	130	122	92 112 105	112.20
10.00	110	136	131	125.67
25.00	153	154	181	162.67
50.00	198	166	152	172.00
100.00	127	90	99	105.33
p	0.62	2040p	2100p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.002
Estimate of the slope is = 1.314820 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001
Resultado: Indicios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, cap.de Sumare
Exp. Date: 12/08/05
Strain: YG1041-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	105	116	136 110 109	115.20
10.00	182	161	205	182.67
25.00	277	307	276	286.67
50.00	374	364	382	373.33
100.00	607	595	606	602.67
p	2.50	910p		

P-value for ANOVA test of dose response < .001
Estimate of the slope is = 5.586442 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001
Resultado: Positivo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, cap.de Sumare
Exp. Date: 12/08/05
Strain: YG1041+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	107	99	104 127 107	108.80
10.00	170	192	178	180.00
25.00	234	262	234	243.33
50.00	298	286	267	283.67
100.00	397	378	372	382.33
p	0.06	1220p	1070p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
Estimate of the slope is = 5.617547 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001
Resultado: Positivo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, cap.de Sumare
Exp. Date: 12/08/05
Strain: YG1042

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	130	169	121 152 134	141.20
10.00	128	146	112	128.67
25.00	161	160	155	158.67
50.00	160	161		160.50
100.00	169	176	181	175.33
p	5.00	640p	630p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.020
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is 0.002
Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, cap.de Sumare
Exp. Date: 12/08/05
Strain: YG1042+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	145	123	137 161 150	143.20
10.00	158	130	148	145.33
25.00	142	152	165	153.00
50.00	208	180	177	188.33
100.00	229	227	210	222.00
p	0.62	1560p	1620p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
Estimate of the slope is = 0.826621 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001
Resultado: Indicios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, cap.de Sumare
Exp. Date: 19/08/05
Strain: YG1042+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	137	160	152 143 132	144.80
10.00	130	160	167	152.33
25.00	213	197	178	196.00
50.00	222	201	207	210.00
100.00	256	427	438	373.67
p	0.62	1710p	1740p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
Estimate of the slope is = 2.021652 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001
Resultado: Positivo

4. Ponto IRIS02900

Test Sample Name: PPP-Rib. Pirai, cap. ETATIII-Indaiatuba
 Source/Batch/Lot: 95268
 Exp. Date: 14/09/04
 Strain: TA98-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	26	24	32	27.33
10.00	20	22	30	24.00
25.00	24	24	27	25.00
50.00	22	26		24.00
p	0.12	452p	420p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.734
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.743

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Rib. Pirai, cap. ETATIII-Indaiatuba
 Exp. Date: 14/09/04
 Strain: TA98+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	26	28	22 26	25.50
10.00	26	21	24	23.67
25.00	26	22		24.00
50.00	22	23	20	21.67
p	0.62	564p	724p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.261
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.964

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Rib. Pirai, cap. ETATIII-Indaiatuba
 Exp. Date: 14/09/04
 Strain: YG1041-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	85	96	105 100 90	95.20
10.00	118	119	94	110.33
25.00	118	116	143	125.67
50.00	93	94	103	96.67
100.00	124	116	131	123.67
p	2.50	670p	670p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.112
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.513

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Rib. Pirai, cap. ETATIII-Indaiatuba
 Exp. Date: 14/09/04
 Strain: YG1041+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	98	85	92 76 78	85.80
10.00	75	70	70	71.67
25.00	80	94	95	89.67
50.00	70	79	115	88.00
p	0.06	1095p	1030p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.261
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.225

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Rib. Pirai, cap. ETATIII-Indaiatuba
 Exp. Date: 14/09/04
 Strain: YG1042-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	119	115	85 100 96	103.00
10.00	98	95	99	97.33
25.00	104	108	126	112.67
50.00	120	119	106	115.00
p	5.00	502p	500p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.211
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.045

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Rib. Pirai, cap. ETATIII-Indaiatuba
 Exp. Date: 14/09/04
 Strain: YG1042+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	110	90	113 110 126	109.80
10.00	106	113	119	112.67
25.00	104	108	101	104.33
100.00	109	109	120	112.67
p	0.62	1710p	1470p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.581
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.770

Resultado: Negativo

5. Captação Artur Nogueira

Test Sample Name: PPP-Agua bruta ETA Artur Nogueira
 Source/Batch/Lot: 99560
 Exp. Date: 05/11/04
 Strain: TA98-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	24	25	30 27 26	26.40
10.00	22	34	23	26.33
25.00	21	23		22.00
50.00	35	23	28	28.67
100.00	21	22	22	21.67
p	0.12	374p	390p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.138
 P-value for the test of the positive dose response (slope at origin) is 0.953

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Agua bruta ETA Artur Nogueira
 Exp. Date: 05/11/04
 Strain: TA98+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	30	31	28 24 32	29.00
10.00	36	30	25	30.33
25.00	40	24	23	29.00
50.00	24	22	23	23.00
100.00	32	22	29	27.67
p	0.62	780p	860p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.431
 P-value for the test of the positive dose response (slope at origin) is 0.800

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Agua bruta ETA Artur Nogueira
 Exp. Date: 05/11/04
 Strain: YG1042-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	125	119	114 114 107	115.80
10.00	91	97	110	99.33
25.00	117	117	106	113.33
50.00	112	89	106	102.33
100.00	98	92	100	96.67
p	5.00	540p	550p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.007
 P-value for the test of the positive dose response (slope at origin) is 0.994

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Agua bruta ETA Artur Nogueira
 Exp. Date: 05/11/04
 Strain: YG1042+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	108	127	115 115 122	117.40
10.00	124	100	121	115.00
25.00	126	108	110	114.67
50.00	136	132	120	129.33
p	0.62	1520p	1670p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.005
 P-value for the test of the positive dose response (slope at origin) is < .001

Resultado: Negativo

6. Ponto JUMI00800

Test Sample Name: PPP-Entr. ETA-Rib Jundiai-Mirim
 Source/Batch/Lot: 92660
 Exp. Date: 19/08/04
 Strain: TA98-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	20	23	22 19 18	20.40
10.00	28	23	18	23.00
25.00	26	18	12	18.67
50.00	24	23	19	22.00
p	0.12	454p	470p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.638
 P-value for the test of the positive dose response (slope at origin) is 0.443

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Entr. ETA-Rib Jundiai-Mirim
 Exp. Date: 19/08/04
 Strain: TA98+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	22	19	18 19 26	20.80
10.00	32	20	27	26.33
25.00	26	23	25	24.67
50.00	19	24	22	21.67
p	0.62	815p	763p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.217
 P-value for the test of the positive dose response (slope at origin) is 0.418

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Entr. ETA-Rib Jundiai-Mirim
 Exp. Date: 19/08/04
 Strain: YG1042-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	121	116	115 108 118	115.60
10.00	105	120	119	114.67
25.00	100	105	93	99.33
50.00	122	115	115	117.33
p	5.00	354p	394p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.007
 P-value for the test of the positive dose response (slope at origin) is 0.999

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Entr. ETA-Rib Jundiai-Mirim
 Exp. Date: 19/08/04
 Strain: YG1042+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	124	108	119 118 153	124.40
10.00	122	125	130	125.67
25.00	128	126	127	127.00
50.00	128	118	119	121.67
p	0.62	1780p	1920p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.943
 P-value for the test of the positive dose response (slope at origin) is 0.619

Resultado: Negativo

7. Rio Atibaia, jusante Rib. Jacaré

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,cap.ribeirao Jacare
 Source/Batch/Lot: 13468
 Exp. Date: 07/06/05
 Strain: TA98-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	26	38	25 34 29	30.40
10.00	41	34	38	37.67
25.00	47	40	42	43.00
50.00	64	72	56	64.00
100.00	76	81	80	79.00
p	0.12	580p	510p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
 Estimate of the slope is = 0.520284 .
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is < .001

Resultado: Positivo

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,cap.ribeirao Jacare
 Source/Batch/Lot: 13468
 Exp. Date: 07/06/05
 Strain: TA98+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	29	32	24 26 28	27.80
10.00	42	40	41	41.00
25.00	42	47	41	43.33
50.00	52	54	60	55.33
100.00	58	64	67	63.00
p	0.62	1300p	1280p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
 Estimate of the slope is = 0.556278 .
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is < .001

Resultado: Positivo

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,cap.ribeirao Jacare
 Source/Batch/Lot: 13468
 Exp. Date: 31/05/05
 Strain: YG1042-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	104	109	97 126 102	107.60
10.00	134	109	110	117.67
25.00	128	122	123	124.33
50.00	150	121	129	133.33
100.00	177	142	155	158.00
p	5.00	390p	340p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.004
 Estimate of the slope is = 0.490406 .
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is < .001

Resultado: Indícios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,cap.ribeirao Jacare
 Exp. Date: 07/06/05
 Strain: YG1042-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	166	222	182 198 174	188.40
10.00	226	199	200	208.33
25.00	236	210	241	229.00
50.00	226	244	223	231.00
100.00	260	255	216	243.67
p	5.00	540p	520p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.013
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is < .001

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,cap.ribeirao Jacare
 Exp. Date: 31/05/05
 Strain: YG1042+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	116	118	113 132 137	123.20
10.00	144	156	145	148.33
25.00	152	133	132	139.00
50.00	142	143	178	154.33
100.00	149	177	169	165.00
p	0.62	2190p	2100p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.007
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is < .001

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,jusante rib.Jacare
 Source/Batch/Lot: 509202
 Exp. Date: 08/07/05
 Strain: TA98-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	36	37	30 36 30	33.80
10.00	30	38	45	37.67
25.00	40	37	41	39.33
50.00	45	49	58	50.67
100.00	70	84	61	71.67
p	0.12	700p	760p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
 Estimate of the slope is = 0.364940 .
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is < .001

Resultado: Positivo

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,jusante rib.Jacare
 Exp. Date: 08/07/05
 Strain: TA98+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	24	40	27 26 27	28.80
10.00	37	26	28	30.33
25.00	37	43	42	40.67
50.00	43	45	35	41.00
100.00	56	56	40	50.67
p	0.62	340p	730p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.007
 Estimate of the slope is = 0.227613 .
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is < .001

Resultado: Indícios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia,jus.rib. Jacare
 Source/Batch/Lot: 0509202
 Exp. Date: 05/08/05
 Strain: TA98+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	20	28	23 24	23.75
10.00	29	21	22	24.00
25.00	25	42	34	33.67
50.00	29	28	34	30.33
100.00	38	29	43	36.67
p	0.62	1030p	950p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.036
 Estimate of the slope is = 0.131767 .
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.003

Resultado: Indícios de mutagenicidade

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,jusante rib.Jacare
 Exp. Date: 08/07/05
 Strain: TA100-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	147	150	157 153 161	153.60
10.00	152	158	153	154.33
25.00	170	161	140	157.00
50.00	140	162	142	148.00
100.00	136	162	153	150.33
p	0.12	380p	400p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.832
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.758

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia,jusante rib.Jacare
 Exp. Date: 08/07/05
 Strain: TA100+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	175	154	152 142 170	158.60
10.00	162	167	186	171.67
25.00	150	168	161	159.67
50.00	160	180	170	170.00
100.00	160	180	170	170.00
p	0.62	470p	500p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.422
 P-value for the test of the positive dose response
 (slope at origin) is 0.129

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, jus.rib. Jacare
Exp. Date: 05/08/05
Strain: YG1041-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	158	140	174	156.20
10.00	184	180	169	177.67
25.00	243	239	249	243.67
50.00	352	357	315	341.33
100.00	400	410	390	400.00
p	2.50	900p	840p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
Estimate of the slope is = 3.672498 .
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is < .001

Resultado: Positivo

Test Sample Name: PPP-Rio Atibaia, jus.rib. Jacare
Exp. Date: 05/08/05
Strain: YG1041+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	140	136	125	135.60
10.00	241	266	242	249.67
25.00	339	288	325	317.33
50.00	383	347	350	360.00
100.00	370	339	365	358.00
p	0.62	1100p	1210p	

Unable to find acceptable linear model under
Bernstein approach
ANOVA 0.043

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia, jusante rib.Jacare
Exp. Date: 08/07/05
Strain: YG1042-S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	118	145	130	128.60
10.00	143	131	136	136.67
25.00	143	121	130	131.33
50.00	130	147	121	132.67
100.00	141	158	154	151.00
p	5.00	390p	320p	

P-value for ANOVA test of dose response is 0.128
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is 0.012

Resultado: Negativo

Test Sample Name: PPP-R.Atibaia, jusante rib.Jacare
Exp. Date: 08/07/05
Strain: YG1042+S9

Code Dose	--	counts	--	Mean
0.00	169	165	167	165.60
10.00	149	146	147	147.33
25.00	142	142	145	143.00
50.00	152	163		157.50
100.00	181	176	169	175.33
p	0.62	1900p	1900p	

P-value for ANOVA test of dose response < .001
P-value for the test of the positive dose response
(slope at origin) is 1.000

Resultado: Negativo