

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

Dissertação de Mestrado

**QUALIDADE AMBIENTAL DA SUB-BACIA DO BAIXO
TAQUARI INFLUENCIADA POR SÍTIO CONTAMINADO EM
PROCESSO DE REMEDIAÇÃO**

PAULA HAUBER GAMEIRO

Porto Alegre, fevereiro de 2015

**Qualidade ambiental da sub-bacia do Baixo Taquari influenciada por sítio
contaminado em processo de remediação**

Paula Hauber Gameiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Vera Maria Ferrão Vargas

Comissão Examinadora

Prof^a Dr^a Catarina da Silva Pedrozo

Dr^a Bibiana Kaiser Dutra

Prof^a Dr^a Kelly Cristina Tagliari de Brito

Porto Alegre, 13 de fevereiro de 2015

"Nem todo ponto final indica fim de história, pode ser só o começo de um novo parágrafo".

Caio Fernando Abreu

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e inspiração.

Aos meus queridos pais João Luís e Mara, por sempre me incentivarem a lutar pelo meu ideal e me dar todo suporte necessário para que eu chegasse ao final de mais uma conquista.

Ao meu querido companheiro Tiago pelo apoio, carinho e amor.

À minha avó Rosália, pela amizade e por estar sempre apostando no meu sucesso.

Aos meus irmãos Gustavo e Augusto, cunhadas e sobrinhos agradeço a todos pelo estímulo para que eu pudesse chegar até o final deste trabalho.

À minha segunda mãe Maria, pelo apoio constante onde a amizade, o carinho e a união sempre estiveram presentes.

Aos meus tios amados (considerados por mim, segundos pais) Zé, Márcia e prima Pam pelo carinho, força e confiança no meu potencial.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela oportunidade de me proporcionar o curso de Pós-Graduação em Ecologia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, aos professores, colegas e funcionários, em especial à Silvana por estar sempre pronta a resolver qualquer problema pendente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado cedida.

À Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler (FEPAM).

À minha orientadora Vera Maria Ferrão Vargas, por me proporcionar a oportunidade de realizar este trabalho, pela qual contribuiu muito para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada pela incansável dedicação, paciência e carinho.

Aos colegas do Laboratório de Mutagênese Ambiental da FEPAM pelo convívio praticamente diário. Primeiramente, não poderia deixar de destacar as colegas que já

estão fora do lab, Mariana e Kelly, mas que foram essenciais para o meu crescimento no laboratório. Obrigada pela paciência para me transmitir todo protocolo necessário da realização dos ensaios. Ao restante dos colegas que também contribuíram muito para a realização dos meus experimentos, entre eles: Tita, Bárbara, Kauê, Duda, Bibi, Déia, Dani, Márcia e em especial a minha pupila Naiara.

À Equipe de amostragem da FEPAM, pela realização das coletas das minhas amostras de sedimento e água.

Aos funcionários, estagiários e bolsistas da Divisão de Biologia da FEPAM.

À Karen da Divisão de Química da FEPAM pelas análises químicas.

Ao Alexandre Brandelli à Jaqueline Delazari do Laboratório Bioensaios, por parte das análises de HPAs.

RESUMO

A contaminação do solo é uma das fontes pela qual os contaminantes são escoados para os ecossistemas aquáticos, afetando a qualidade dos sedimentos. Neste compartimento alguns compostos são capazes de bioacumular e interferir nos fluxos de energia e de nutrientes da cadeia biológica, gerando efeitos agudos, crônicos e genotóxicos para as comunidades que vivem ou entram em contato com este local. A região de estudo está localizada em área às margens do rio Taquari, no município de Triunfo, RS, próxima a um sítio com solo contaminado por preservantes de madeira, com passivo ambiental identificado (creosoto, pentaclorofenol e a hidrossal CCA). Esta área foi submetida à primeira fase do processo de intervenção para retirada das principais fontes ativas. Em estudos anteriores foi definido o provável escoamento de contaminantes para o rio a partir do solo contaminado. Para avaliar a qualidade dos sedimentos, nas diferentes fases de intervenção da área, foi utilizado o ensaio *Salmonella*/microsossoma, para avaliar mutagênese, além da dosagem de HPAs nos extratos orgânicos de sedimentos. Foram testados quatro áreas de coleta, identificadas pela distância em Km a partir da foz, abrangendo local a montante do sítio, Ta032, em frente, Ta010, e a jusante, Ta006 e Ta004. As coletas foram nas fases, antes (inverno e verão), durante (verão) e após (verão) o processo de intervenção. A mutagênese foi avaliada através de linhagens que medem erro no quadro de leitura (TA98 e Ta97a) e substituição de pares de bases (TA100), na presença e ausência de S9mix (\pm S9) em extratos de compostos moderadamente polares de sedimento. Os resultados indicaram presença de pró-mutágenos em todas as amostragens na área Ta010, sendo mais elevada na anterior à intervenção (verão) para TA100+S9 (1672 rev/g) decrescendo durante e após este processo. Foram também observados valores constantes de HPAs totais e presença das espécies com potencial cancerígeno nos diferentes períodos avaliados. O

local Ta006, após a intervenção, foi o que mostrou mutagênese mais alta (764 rev/g), sendo que as espécies consideradas cancerígenas foram detectadas em maiores concentrações, em especial o benzo(b+k) fluoranteno, que também esteve elevado, neste período, em Ta004. Presença de mutagênese e HPAs em arroio interno ao sítio, a montante de Ta010, marcaram uma das rotas de dispersão dos contaminantes. A presença de contaminação em frente ao sítio, após a intervenção, pode estar relacionada com a técnica escolhida para retirada das fontes ativas, contribuindo na presença de contaminantes a jusante deste rio, Ta006 e Ta004.

Palavras-chave: *Salmonella*/microsoma; preservantes de madeira; escoamento de compostos genotóxicos, HPAs, remediação, intervenção.

ABSTRACT

Soil contamination is one of the sources of contaminant runoff into aquatic system, affecting sediment quality. In this compartment some compounds can bioaccumulate and interfere in the energy and nutrient flux of the biological chain with acute, chronic and genotoxic effects on the communities who live there or have contact with this place. The region studied is located on the area on the banks of Taquari river, in the municipality of Triunfo, RS, close to a site with soil contaminated by wood preservatives and identified environmental liabilities (creosote, pentachlorophenol and hydrosalt CCA). This area was submitted to the first stage of the intervention process to remove the main active sources. Previous studies defined the probable runoff of contaminants into river from contaminated soil. In order to evaluate the sediment quality in the different phases of intervention in the area, the *Salmonella*/microsome assay was used to evaluate mutagenesis, besides the dosage of PAHs in the sediment organic extracts. Four collection areas were tested, identified by the distance in km from the mouth, covering a location upstream from the site, Ta032, in front, Ta010, and downstream, Ta006 and 004. The collections were performed in the phases, before (winter and summer), during (summer) and after (summer) the intervention process. Mutagenesis was evaluated using frameshift (TA98 and Ta97a) and base pair substitution (TA100) strains in the presence and absence of S9mix (\pm S9), in extracts of moderately polar sediment compounds. The results indicate the presence of pro-mutagens in all samplings in the Ta010 area, and it is higher before the intervention (summer) for TA100+S9 (1672 rev/g) decreasing during and after this process. Constant values of total PAHs and presence of species with a carcinogenic potential were also observed in the different periods evaluated. Site Ta006, after intervention, showed the highest mutagenesis (764 rev/g), and the species considered carcinogenic were detected

at higher concentrations, especially benzo(b+k) fluoranthene, which was also high during this period at Ta004. The presence of mutagenesis and PAHs in a stream inside the site, upstream from Ta010 marks one of the contaminant dispersion routes. The presence of contamination in front of the site after intervention may be related to the technique chosen to remove the active sources, contributing to the presence of contaminants downstream of this river, Ta006 and Ta004.

Key words: *Salmonella*/microsome; Wood preservatives; runoff of genotoxic compounds, PAHs, remediation, intervention.

LISTA DE ABREVIACOES

2AF - aminofluoreno

4NQO - oxidonitroquinolina

AZS - azida sódica

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCA – Arseniato de cobre cromado

CCB - borato de cobre cromado

CCME - Canadian Council of Ministers of the Environment

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CONSEMA - Conselho Estadual do Meio Ambiente

DCM - diclorometano

DMSO - dimetilsulfóxido

FEPAM - Fundação Estadual de Proteção Ambiental Luis Henrique Roessler

HPA/PHA – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

IARC – Agência de Pesquisa sobre o Câncer

ISQG - Interim Sediment Quality Guidelines

MOE/EOM – Massa orgânica extraída

PEL - Probable Effect Level

PCP - Pentaclorofenol

S9 - fração de metabolização

US EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

TEL – Threshold Effect Level

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Localização da área de estudo às margens do Rio Taquari e os pontos de amostragens17

Figura 2. Área da usina de preservação de madeira. Fonte: Google.18

ARTIGO - Atividade mutagênica de sedimento de sub-bacia influenciada por área com solo contaminado em processo de remediação no sul do Brasil

Figura 1. Localização da Bacia Hidrográfica Taquari-Antas e dos locais de amostragens do Rio Taquari, Ta032, Ta010 Ta006, Ta004 e do Arroio interno do sítio contaminado. Os números mostram a distância em km a partir da foz.28

Figura 2. Porcentagem de células sobreviventes no ensaio Salmonella/microsoma avaliando extratos orgânicos de sedimento em quatro amostragens, antes, durante e após o processo de intervenção. Os valores abaixo de 60% (linha pontilhada) indicam citotoxicidade. Para o cálculo da porcentagem foram considerados os seguintes valores: amostras não citotóxicas - a última dosagem utilizada (80 µg de sedimento seco); e amostras citotóxicas - a menor dosagem citotóxica; Ta010 - local em frente ao sítio de solo contaminado; arroio interno do sítio contaminado..35

Figura 3. a - Potência mutagênica em revertentes por grama seca equivalente de sedimento seco expressa pela soma total das linhagens que detectam mutágenos que causam danos por erro no quadro de leitura (TA98 e TA97a) e substituição de pares de bases (TA100), na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica nos diferentes locais e amostragens; b - somatório das respostas -S9; c-somatório das respostas +S9; Ta010 local em frente ao sítio de solo contaminado..39

Figura 4. Concentração Total de HPAs enfatizando a soma dos HPAs potencialmente carcinogênicos (Grupo 1: Carcinogênicos aos humanos; Grupo 2A: Provavelmente carcinogênicos aos humanos; Grupo 2B: Possivelmente carcinogênico aos humanos) e Outros HPAs: espécies consideradas não carcinogênicas em amostras de extrato orgânico de sedimentos, nas quatro amostragens: antes, durante e após o processo de intervenção.....42

Figura 5. Concentração dos HPAs potencialmente cancerígenos (Grupo1: Carcinogênicos aos humanos; Grupo 2A: Provavelmente carcinogênicos aos humanos; Grupo 2B: Possivelmente carcinogênico aos humanos); avaliados nos extratos orgânicos de sedimentos, nas quatro amostragens do processo de intervenção.43

LISTA DE TABELAS

ARTIGO - Atividade mutagênica de sedimento de sub-bacia influenciada por área com solo contaminado em processo de remediação no sul do Brasil

Tabela 1. Relação das possíveis fontes poluidoras e os usos do Rio Taquari nos locais de estudo.....28

Tabela 2. Classificação granulométrica das amostras do Rio Taquari nas quatro amostragens, antes, durante e após o processo de intervenção31

Tabela 3. Respostas Mutagênicas e citotóxicas de extratos orgânicos de sedimento (revertentes/g equivalentes de sedimento seco) na presença e ausência de S9 mix em quatro locais de amostragem no Rio Taquari, antes, durante e após o processo de intervenção.....36

Tabela 4. Concentração de doze HPAs avaliados em extratos orgânicos de sedimento do Rio Taquari nas quatro amostragens do processo de intervenção comparadas com os valores-guia (CCME, 2002) adotados pela legislação brasileira (Brasil, 2004) que estabelecem diretrizes e procedimentos mínimos para a avaliação de material dragado e comparação com a potência mutagênica observada48

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Lista de Abreviações.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Ecossistemas aquáticos.....	1
1.2. Contaminação de solo.....	3
1.3. Remediação de solos.....	6
1.4. Preservantes de madeira.....	7
1.5. Ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma.....	12
2. ÁREA DE ESTUDO.....	14
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Geral.....	19
3.2. Específicos.....	19
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	20
Resumo.....	22
1. Introdução.....	23
2. Materiais e métodos.....	25
2.1. Área de estudo.....	25
2.2. Intervenção para retirada de fontes ativas.....	26

2.3. Pontos de amostragem	27
2.4. Coleta das amostras	29
2.5. Preparação das amostras	29
2.6. Caracterização granulométrica	30
2.7. Ensaio Salmonella/microsoma	30
2.8. Análises de dados.....	32
2.9. Análise química	33
3. Resultados e discussões	34
4. Conclusões.....	49
5. Referências bibliográficas	50
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
7. ANEXO.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ecossistemas aquáticos

A qualidade dos ecossistemas aquáticos tem sido alterada em diferentes escalas nos últimos séculos. Este fator está diretamente associado às atividades antrópicas que dependem do uso desses recursos hídricos, acarretando em degradação ambiental significativa através de lançamentos de contaminantes que podem comprometer a diversidade biológica e a qualidade desses ecossistemas (Soldán & Bodurová, 2013).

A poluição dos ambientes aquáticos tem se tornado uma preocupação mundial, sendo suas consequências mais evidentes: a escassez de fontes limpas para abastecimento e a mortandade dos organismos. As principais fontes de contaminação são atribuídas aos resíduos industriais, agrícolas, comerciais e domésticos (Houk, 1992; Claxton et al., 1998), ou mesmo a partir de solos contaminados (Costa et al., 2012). Muitos efluentes são extremamente complexos, do ponto de vista físico e químico, e são fontes de grande diversidade de poluentes para o ambiente aquático (Zagatto & Betolleti, 2008). Alguns estudos estimam que cerca de cem mil produtos químicos estão em uso diário, sendo que muitos desses são desconhecidos e podem apresentar propriedades genotóxicas (Holt, 2000; Ohe et al., 2004).

Os contaminantes são influenciados pelas características naturais dos locais, e podem ser transportados, transformados e/ou bioacumulados (Chen & White, 2004; Ohe et al., 2004; Perelo, 2010). Alguns poluentes persistem no ambiente, associados ao sedimento, podendo muitas vezes ter ação mutagênica. Uma vez presentes neste compartimento, as substâncias se depositam por longo tempo, tornando-se mais concentradas do que aquelas em meio líquido, gerando efeitos agudos, crônicos e mutagênicos em comunidades que vivem ou entram em contato com o sedimento (Boldrini et al., 1990; Mozeto, 2004). Segundo Jha (2004) o acúmulo de mutações

hereditárias em um organismo, contribui com a redução da diversidade genética da fauna e flora presente no local contaminado. Pollack et al. (2003) reforçam que compostos químicos não oferecem apenas riscos a biótica aquática, mas também afetam a saúde humana.

Os sedimentos são formados por partículas de grande variedade de tamanho, formas geométricas e composição química. Estas são transportadas pela água, ar ou gelo e, posteriormente, depositadas nos rios, lagos, represas, áreas alagáveis e oceanos (Mozeto, 2004). Além dessas origens, os sedimentos contêm materiais precipitados por um grande número de processos químicos e biológicos, sendo que a proporção de partículas autóctones e alóctones varia muito entre diferentes ambientes.

Diversos estudos têm sido realizados com amostras de sedimento visando comprovar a presença de agentes mutagênicos em ambientes aquáticos. A extensa revisão da literatura descrita por Chen & White (2004) destaca 85 estudos em diversos locais do mundo que mostram a preocupação com exposição de organismos aquáticos e saúde humana aos compostos mutagênicos presentes nos sedimentos. Neste sentido, os autores apontam que, embora a exposição do homem a sedimentos mutagênicos seja restrita, a remobilização de contaminantes para a água e a possibilidade do consumo de biota aquática contaminada pela bioacumulação desses produtos, podem contribuir com o desenvolvimento de câncer.

Nas últimas décadas foram realizados trabalhos sobre os efeitos de contaminantes a organismos aquáticos. Estes resultaram no estabelecimento de critérios da qualidade da água, utilizados para a proteção da vida aquática em vários países, como, por exemplo, Canadá, França e Estados Unidos (Environment Canada, 1971; France, 1983; USEPA, 1991). No Brasil algumas regulamentações que limitam os parâmetros de qualidade da água têm sido promulgadas, dentre elas, a resolução nº357

(Brasil, 2005), que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes entre outras providências. No Rio Grande do Sul, a Resolução CONSEMA n° 129 complementa os parâmetros de avaliação química de efluentes e dispõe sobre critérios e padrões de emissão para toxicidade de efluentes líquidos lançados em águas superficiais no Estado (Rio Grande do Sul, 2006).

Programas de monitoramento ambiental adotam informações para a avaliação da qualidade dos sedimentos (Mozeto et al., 2006). O critério utilizado pela CETESB (CETESB, 2004) representado em função das concentrações de contaminantes, com vistas à proteção da vida aquática, foi baseado em valores guia, estabelecidos pelo Conselho Canadense de Ministros do Meio Ambiente (CCME, 2002) para arsênio, metais pesados e compostos orgânicos. Os mesmos valores guia foram adotados pela resolução CONAMA 344/04 (Brasil, 2004) que estabelecem diretrizes e procedimentos mínimos para a avaliação de material dragado. Neste guia são informados os valores do ISQG (*Interim Sediment Quality Guidelines*) que representa o valor orientador de referência de qualidade de sedimentos, também designado TEL (*Threshold Effect Level*), concentração abaixo da qual raramente são esperados efeitos adversos para os organismos, e pelo valor do PEL (*Probable Effect Level*), que representa a concentração acima da qual é frequentemente esperado efeito deletério sobre a biota. Na faixa entre TEL e PEL, situam-se os valores onde ocasionalmente espera-se tais efeitos (CCME, 2002; CETESB, 2006).

1.2. Contaminação de solo

O solo é um compartimento altamente dinâmico composto por agregados não consolidados de minerais e matéria orgânica, produzidos pela complexa combinação de processos físicos, químicos e biológicos (White & Claxton, 2004). Considerado a base

do ecossistema terrestre, o solo contribui com inúmeras funções ecológicas, entre elas: o controle de infiltração, percolação e a retenção da água, participação de trocas gasosas e a dinâmica dos nutrientes minerais e da matéria orgânica do solo, e fornece habitats para a fauna residente (Yu et al., 2013; Bottinelli et al., 2015). Estas propriedades são altamente dinâmicas (Kay, 1990) sujeitas a serem influenciadas por inúmeras variáveis ambientais, dentre elas é possível destacar a topografia e clima, atividades antrópica e biológicas (Dexter, 1988; Kay, 1990). Como consequência da industrialização e da produção industrial, grandes quantidades de resíduos tóxicos são gerados e despejados nos solos, sendo muitas vezes devido a falta de um local apropriado (Singh et al., 2006). Informações inadequadas sobre a toxicidade dos resíduos, mau planejamento e má gestão dos locais de descarte tem ocasionado graves problemas de contaminação (White & Claxton, 2004).

As características dos solos influenciam nas respostas de toxicidade e na rota dos contaminantes presentes, tornando este uma importante via de exposição (Sedman, 1989). Como exemplo, as partículas finas de argila possuem carga negativa capazes de reter íons carregados positivamente de metais tóxicos, tais como zinco, cobre, alumínio, cromo, arsênio, níquel e cádmio. Além disso, o estado de oxidação de um determinado tipo de solo pode modificar drasticamente a toxicidade de metais, tais como alumínio e arsênio. Poluentes orgânicos com solubilidade limitada na água (por exemplo, hidrocarbonetos aromáticos, pesticidas clorados, etc.) são normalmente sorvidos na matéria orgânica e partículas de argila do solo. Estes contaminantes no solo, de uma maneira geral, não apresentam deslocamento contínuo, como ocorre na circulação atmosférica e na água superficial. Tendem a ficar mais estáveis no local, permanecendo um tempo maior e em concentrações mais elevadas nas partículas do solo (Masood & Malik, 2013), agindo como um filtro ambiental. Porém, essa capacidade é limitada,

porque o solo também pode funcionar como fonte, rota e receptor de contaminantes (Lemos et al., 2009), características estas que estão diretamente relacionadas as suas propriedades físicas, dos produtos químicos presentes e suas concentrações (Bone et al., 2010; CETESB, 2011).

Entre os principais contaminantes com propriedades tóxicas e genotóxicas do solo estão os compostos orgânicos, em especial o grupo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), além de metais pesados (Da Silva Júnior & Vargas, 2009). Nos últimos anos esta poluição do solo tem aumentado devido às emissões atmosféricas contínuas de compostos provenientes principalmente de fontes industriais, e veiculares (White & Claxton, 2004). Tal contaminação pode ser resultado de atividades intencionais ou acidentais, através da aplicação de agroquímicos em cultivos, de práticas de irrigação com águas contaminadas, da deposição de resíduos em áreas específicas (aterros, lagoas de tratamento, eliminação de resíduos, entre outros), do descarte indiscriminado de materiais e de vazamentos/derrames durante a produção, transporte ou armazenamento de materiais industriais como óleos e solventes (White & Claxton, 2004; Rodrigues et al., 2009).

A presença de agentes genotóxicos no solo pode ter efeito sobre a saúde humana através da inalação de poeira, ingestão de plantas que absorvem os compostos do solo, bem como pela drenagem destes até águas subterrâneas e superficiais, que são utilizadas para abastecimento, recreação, pesca, agricultura, entre outras atividades (Monarca et al., 2002; Lah et al., 2008; Da Silva Júnior & Vargas, 2009).

Com a necessidade de prevenção da contaminação de solos, leis foram criadas pelos órgãos públicos para estabelecer uma gestão eficaz sobre este compartimento. No Brasil, por exemplo, a resolução nº 420 (Brasil, 2009), dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e

estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. No entanto, esta legislação não contempla, a exemplo de outras no país como a CONAMA n° 357 (Brasil, 2005) e a CONSEMA n° 129 (Rio Grande do Sul, 2006), ensaios biológicos que permitem definir, pelo efeito, a presença destes compostos, que, mesmo em baixas dosagens, formam misturas complexas de alta reatividade (Vargas et al., 2008).

1.3. Remediação de solos

Muitos dos poluentes genotóxicos e/ou carcinogênicos podem ser detectados após vários anos de exposição, o que destaca a necessidade de ações preventivas (Tagliari et al., 2004) ou considerar a importância da remediação de um sítio contaminado por compostos químicos. A remediação é definida pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) como um conjunto de ações corretivas aplicáveis a um determinado sítio contaminado por resíduos perigosos. Em 1986, a USEPA formulou a primeira seqüência de procedimentos de correção de uma área contaminada. Estas ações corretivas foram desenvolvidas em diferentes fases, sendo a inicial uma vistoria e avaliação preliminar do sítio, passando pela proposição de técnicas de remediação até a implantação das medidas corretivas e estabilizadoras (Bartenfelder, 1992). Neste período, no Brasil, em 1987, ocorreu o acidente com o céσιο-137 em Goiânia e, segundo Terra & Ladislau (1991), “a não definição dos culpados pelo acidente é que retarda o devido atendimento às vítimas, seja médico, seja financeiramente” o que caracteriza uma ação desarticulada das instituições, por falta de leis específicas sobre a contaminação industrial, e suas consequências na saúde humana.

Dentro deste contexto, nos últimos anos, em São Paulo, um número expressivo de trabalhos envolvendo o gerenciamento de áreas contaminadas por resíduos industriais e proposições para remediação de sítios foram se multiplicando, tais como

Marker et al. (1994), Pompeia (1994), CETESB (1999), Crozera (2001), Borba (2002), Marker (2008).

Várias tecnologias de remediação têm sido desenvolvidas para remoção de poluentes, dentre elas destacam-se a precipitação, coagulação, floculação, incineração, alteração de íons, osmose reversa, filtração de membranas, eletroquímica, fotoeletroquímica, processos de oxidação avançada, e métodos biológicos que tem demonstrado diferentes graus de eficiência de remediação (USEPA, 2004; Gana et al., 2009; Gao et al., 2014). Destas, as técnicas tradicionais de remediação ainda prevalecem para o tratamento de solos contaminados, em especial as de escavação e eliminação do solo que contabilizam, em média, 30% de tais atividades (Liedekerke et al., 2014).

1.4. Preservantes de madeira

A madeira tem desempenhado um papel vital no desenvolvimento social, econômico e ambiental da história humana. Ela tem sido usada por muitos séculos principalmente como material de construção, por ser um recurso renovável de alta resistência, preço relativamente baixo e facilmente produzida (Behzad et al., 2012). Pela sua origem orgânica, a madeira está sujeita à deterioração por agentes biológicos como: insetos, fungos, bactérias, moluscos e crustáceos, quando exposta às condições ambientais (Cavdar, 2014). Para elevar a vida útil das madeiras são utilizados tratamentos com conservantes para prevenir a ação dos agentes biológicos, tornando uma alternativa de preservar a pressão sobre as florestas nativas, pois com o aumento da vida útil da madeira é possível maior conservação dos recursos naturais florestais (Hingston et al., 2001).

O tratamento preservativo permite a proteção das camadas externas permeáveis da madeira contra a ação dos organismos, de modo que impeça a sua penetração e a posterior infestação nos tecidos lenhosos das camadas mais internas (Vidor, 2003).

Existem diversos métodos de preservação utilizados por todo mundo, entre eles os naturais, indiretos, químicos e biológicos. O método amplamente utilizado para prevenir o ataque de organismos xilófagos é o da introdução na madeira de substâncias químicas tóxicas a esses organismos que impedem o seu desenvolvimento. Entre os mais eficientes são aqueles aplicados sob condições de vácuo e pressão e, dentre estes, o mais importante é o de célula cheia ou Processo Bethell (John Bethell / Inglaterra / 1838), que tem por finalidade preencher ao máximo as células da madeira com o preservativo (Cockcroft, 1971).

As características ideais de um preservativo de madeira englobam a mínima toxicidade aos seres vivos, proteção da madeira contra os organismos xilófagos, retenção do produto na madeira ao longo dos anos e custo reduzido (Cavdar, 2014). Além disso, não deve ser inflamável e alterar as características da madeira e dos materiais em contato com ela. Porém, o que se sabe é que este preservativo não foi encontrado ainda e que as substâncias com maior eficácia apresentam toxicidade e os produtos relativamente atóxicos são ineficientes como preservantes (Appel et al., 2007). A aplicação destes preservativos só é economicamente viável se a vida útil da madeira for significativamente aumentada em relação àquela usada sem tratamento (Appel et al., 2007).

As substâncias utilizadas como conservantes são conhecidas como biocidas, e são agrupadas em duas grandes classes: as oleossolúveis e as hidrossolúveis. Entre os preservativos oleosos, destaca-se o pentaclorofenol (PCP) e o creosoto e como exemplos dos hidrossolúveis, o arseniato de cobre cromado (CCA) e o borato de cobre cromado (CCB). Estes preservativos com ação prolongada são os mais utilizados e responsáveis por cerca de 80% da madeira tratada existente no mundo (Lepage, 1986; Appel et al., 2007).

O pentaclorofenol é um poluente orgânico persistente que contém em sua composição e como produto de degradação, dioxinas e furanos. A degradação deste composto no meio ambiente ocorre por processos químicos, microbiológicos e fotoquímicos (Choudhury et al., 1986). No solo, a decomposição microbiana parece ser um mecanismo importante e potencialmente dominante de remoção deste composto (Choudhury et al., 1986). Além disso, a descloração anaeróbia redutiva realizada principalmente por organismos aeróbicos é uma via importante para a degradação de compostos orgânicos altamente clorados, tais como o PCP (Adrian & Gorisch, 2002).

Esse preservativo, também conhecido como Pó da China, é um dos produtos controlados no Tratado PIC GLOBAL - informação e consentimento prévio em caso de comércio ou transporte internacional - (Appel et al., 2007). No Brasil, deixou de ser produzido na década de 70 e foi proibido em 1985, através da portaria de nº 329 do Ministério da Agricultura (Brasil, 1985). O efeito negativo de PCP em populações microbianas do solo é reconhecido já há algum tempo (Brown et al., 1978) e pode ocorrer a níveis tão baixos como 4 mg L^{-1} PCP no solo e sistemas aquosos (Davis et al., 1996). Além disso, os seres humanos podem ser expostos através da inalação, dieta, ou contato com a pele (Eisler, 1989) e provocar numerosas doenças e mortes ocupacionais (Yu et al., 2014). Portanto, o PCP é considerado como poluente prioritário pela USEPA, classificado como possivelmente carcinogênico ao homem (grupo 2B) pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) (IARC, 1991; Sheng et al., 2013). Estes fatos, aliados à legislação que impõe crescentes restrições ao uso de biocidas organoclorados, tem desestimulado o uso deste preservativo, embora seja um dos mais eficientes na proteção da madeira.

O creosoto é uma substância oleosa obtida através da destilação de alcatrão de hulha que contém uma mistura de HPAs (85%), compostos fenólicos (10%) e

compostos heterocíclicos aromáticos N, Se, O (5%) (Rogers et al., 2007). Quando utilizado, é empregado normalmente em combinação com o PCP (Taylor & Smith, 1997), pois facilita a penetração desses compostos na madeira, como também aumenta a solubilidade deles dentro do solo (Mills et al., 2006). Entretanto, o seu uso no Brasil foi proibido em 1998, pelo Decreto – lei n° 264 (Brasil, 1998). Apresenta-se insolúvel em água e não se fixa na madeira por reações químicas, apenas adere às paredes celulares ou se deposita no lume das células. Os constituintes do creosoto e seus metabólitos são conhecidos por serem tóxicos e alguns mutagênicos.

Os HPAs são uma classe de poluentes orgânicos, que apresentam efeitos cancerígenos, teratogênicos, e mutagênicos (Kim et al., 2007). Eles são comumente encontrados em locais contaminados (Bozlaker et al., 2008), pois podem facilmente se aderir à matéria orgânica do solo (Rivas et al., 2000), e alguns HPAs são resistentes a biodegradação (Wilson & Jones, 1993). A sua persistência no meio ambiente depende, principalmente, de suas características físicas e químicas (Lladó et al., 2013). Há 16 dos HPAs identificados pela USEPA como poluentes prioritários baseado na toxicidade, potencial para exposição humana, e frequência de ocorrência em locais de resíduos perigosos (Liao et al., 2014). Alguns deles também são classificados pela IARC como compostos de maior atenção por sua potencialidade carcinogênica (IARC, 2010).

Atualmente, o conservante de madeira mais amplamente utilizado no mundo é o CCA, produto pertencente ao grupo dos compostos inorgânicos formado pelos metais arsênio (As), cromo (Cr) e cobre (Cu) (Hingston et al., 2001; Mercer & Frostick, 2014). São preservantes à base de água, ou seja, são hidrossolúveis constituídos pela associação de vários sais. A solução aquosa destes, ao penetrar na madeira, sofre reações de fixação e produz compostos insolúveis que dificilmente serão lixiviados. Este grupo tem substituído tipos de conservantes orgânicos alternativos, como o

creosoto e pentaclorofenol para uso aquático, devido às preocupações ambientais e da saúde humana. No Brasil sua fabricação é regulamentada pela Norma NBR-8456. Porém, em países, como Canadá, EUA, Reino Unido, Austrália e Noruega o uso do CCA como um preservativo de madeira têm sido limitado (Mercer & Frostick, 2014).

As reações que ocorrem na madeira durante a fixação do CCA tem uma grande influência sobre as espécies de metais que são emitidos a partir da madeira e a toxicidade subsequente destes lixiviados. A toxicidade de Cu, Cr e As para organismos aquáticos é muito registrada (Bodek et al., 1988; Walley et al., 1996a, b), sendo estes metais listados como poluentes prioritários pela USEPA (Weis et al., 1992;. Weis & Weis, 1995). Porém, a toxicidade é altamente dependente da forma específica que o composto está presente no meio (Hingston et al., 2001). O Cr no estado de oxidação (VI) é conhecido por ser cancerígeno e mutagênico, mas se reduzido a Cr (III), tal como durante o processo de fixação do CCA, pode ser significativamente menos prejudicial (Sanders & Reidel, 1987). O As também é considerado cancerígeno e mutagênico, bem como teratogênico e, dos estados de oxidação predominantes, As (V) é a forma mais prevalente e menos tóxica do que o As (III).

O composto CCB é um produto alternativo ao CCA que tem como ingredientes ativos o óxido cuproso e o boro. Existem dúvidas em relação a sua resistência à lixiviação e sua eficiência, em longo prazo, no combate aos insetos (Lepage, 1986). Os compostos de boro, apesar de terem menor toxicidade, não se fixam adequadamente na madeira (Appel et al., 2007).

Diante dessa realidade, é importante destacar que todos os produtos utilizados na preservação da madeira devem ser tóxicos aos organismos biológicos que degradam a madeira, por consequência, podem ser tóxicos ao homem e animais não alvo, portanto seu uso exige cuidados específicos, visando preservar a vida e o meio ambiente.

1.5. Ensaio *Salmonella*/microsoma

As evidências de que os resíduos industriais podem induzir efeitos genotóxicos em espécies aquáticas e terrestres (incluindo os humanos) tem estimulado as pesquisas nesta área, gerando progressos no desenvolvimento e uso de bioensaios genéticos de curto prazo. A sua simplicidade, sensibilidade a danos genéticos, a velocidade relativa, baixo custo de experimentação e a pequena quantidade de amostra necessária para a análise permitiram que a pesquisa em toxicologia genética evoluísse. Os resultados de bioensaios genéticos são relevantes para a saúde humana, pois o alvo toxicológico é o DNA, o que existe em todas as formas de vida celular. Assim, pode ser extrapolado que os compostos considerados reativos à molécula de DNA de uma espécie têm o potencial de produzir efeitos semelhantes em outras espécies. Em geral, as perturbações do material genético são prejudiciais para o organismo e podem levar a graves consequências para a saúde e são irreversíveis. Efeitos na saúde humana comumente associados com a exposição a compostos genotóxicos incluem câncer, má formação de fetos, doenças cardíacas, dentre outras (Houk, 1992).

Existem diversos ensaios para detectar a mutagenicidade/genotoxicidade de amostras ambientais, mas a utilização de ensaios com bactérias provaram ser mais eficazes para monitoramento por serem bastante sensíveis, confiáveis e com custo relativamente baixo. Entre os bioensaios microbianos, o ensaio *Salmonella*/microsoma é o método usado mais amplamente para identificar atividade mutagênica em amostras ambientais, além de auxiliar na comparação de sítios, identificação de fontes e possíveis carcinógenos presentes em misturas ambientais complexas (Claxton et al., 2010). Este teste permite determinar a mutagenicidade, mas não especificamente a carcinogenicidade, de compostos e de misturas complexas (Zeiger, 1998; Mortelmans & Zeiger, 2000). No entanto, devido a muitos cancerígenos atuarem em mecanismos

mutagênicos, a maioria dos agentes cancerígenos orgânicos que são mutagênicos são positivos no ensaio de *Salmonella* (Zeiger, 1998). Diante desse fato, este ensaio é utilizado, no presente contexto, em muitos trabalhos com diferentes matrizes ambientais, tais como para águas superficiais (Ohe et al., 2004; Vargas et al., 2008), sedimentos (Chen & White, 2004; Tagliari et al., 2004), água potável (Richardson et al., 2007; Pereira et al., 2007), solo (White & Claxton, 2004; Pohren et al., 2012) e ar (Claxton et al., 2004; Coronas et al., 2013).

O ensaio *Salmonella*/microsoma foi desenvolvido por Ames (1971), sendo revisado por Maron & Ames et al. (1983) e modificado por Kado et al. (1986). Baseia-se na utilização de linhagens de *Salmonella typhimurium* com mutações preexistentes (geradas pela engenharia genética) que tornam as bactérias incapazes de sintetizar o aminoácido essencial, histidina e portanto, incapazes de crescer e formar colônias na sua ausência. Através de mutação reversa podem restaurar a função do gene e permitir que as células sintetizem histidina, podendo crescer no meio mínimo e formar colônias. As linhagens de *Salmonella* usadas no teste têm diferentes mutações em vários genes do operon da histidina e cada uma destas mutações é sensível a classes de compostos mutagênicos diferentes (Mortelmans & Zeiger, 2000)

O diagnóstico da qualidade de sedimentos, através do ensaio *Salmonella* tem sido realizado em diversos locais do mundo (Chen & White, 2004; Rigau et al., 2012; Hudcova et al., 2013; Perovic et al., 2013, Warren et al., 2015). Especificamente no Rio Grande do Sul, o ensaio tem sido utilizado em estudos realizados por Tagliari et al. (2004), que evidenciaram a mutagenicidade de sedimento em ambientes aquáticos associada a altos níveis de estresse oxidativo em peixes em área de influência de curtumes; Horn et al. (2004) mostrando resposta mutagênica em sedimentos relacionados à contaminação de indústria petroquímica; e Costa et al. (2012) verificando

que o sedimento do rio Taquari, área do presente estudo, possui como fonte de produtos perigosos o escoamento superficial de sítio de solo contaminado.

Combinado a este teste, é avaliada a citotoxicidade das amostras, pois a morte celular pode mascarar a resposta mutagênica (Vargas et al., 1993). Assim sendo, a utilização destes testes permite diagnóstico precoce dos recursos hídricos antes que o efeito crônico ou agudo se estabeleça.

2. Área de Estudo

O estudo foi realizado no Rio Taquari, pertencente à bacia Taquari-Antas, próximo às margens de área influenciada por sítio de solo contaminado, localizada no distrito de Barreto, município de Triunfo, Rio Grande do Sul, Brasil. Este rio possui aproximadamente uma extensão de 500 km desde sua nascente até a foz. Está situado em uma das regiões mais desenvolvidas do estado, onde se concentra uma grande área antropizada que utiliza suas águas para o abastecimento público e industrial, agricultura, navegação, recreação, pesca e geração de energia elétrica (Terra et al., 2008) (Figura 1).

A área do presente estudo abrigou uma usina de preservação de madeira que iniciou suas atividades em 1960, realizando o tratamento de madeiras em autoclave, para exploração, produção, preservação, fabricação de postes de iluminação elétrica e outros produtos derivados de madeira (cruzetas, canaletas, toras e mourões de cerca) (Figura 2). O terreno em que se localiza a empresa é essencialmente plano, com pequena declividade no sentido oeste-noroeste. A área industrial foi aterrada com solo da própria região durante a fase de instalação da atividade e essa camada tem espessura que varia entre 0,5m e 4m, elevando a porção do terreno em relação à vizinhança. O aquífero é do tipo freático, com profundidades do nível d'água entre 1,6m e 5,0m aproximadamente, e o fluxo subterrâneo apresenta sentido oeste, rumo ao rio Taquari.

Junto à área da usina, a elevação do terreno configura um divisor das águas subterrâneas. Devido às suas características, o sítio apresenta alta susceptibilidade quanto ao potencial de contaminação do solo, da água subterrânea e das águas superficiais.

Durante sua atividade utilizou como preservantes os compostos PCP (1960 a 1982); creosoto (1960 a 1982); e CCA (de 1982 até 2005). Estudos anteriores nesta área detectaram a presença de HPAs, PCP e metais pesados com atividade mutagênica no solo (Pohren et al., 2012) e definiram a potencialidade de escoamento de contaminantes para o rio a partir de solo contaminado (Costa et al., 2012). Atualmente a empresa está desativada e incluída nos estudos de impacto ambiental da FEPAM.

As investigações confirmatórias para estabelecer a presença de contaminação do solo, água subterrânea e compartimento atmosférico foram iniciadas a partir de 2004. Essas ações permitiram estabelecer dez áreas como hot spots, onde foram identificadas fontes primárias ativas de contaminação, necessitando de “intervenção objetiva”, a qual foi iniciada em 2012. O projeto de intervenção realizado junto ao solo incluiu as áreas de processo da empresa, como: saída da autoclave, fossa de preparação dos preservantes, lagoa de tratamento, pluma de “fase livre” localizada entre estas áreas de processo, depósitos de resíduos e duas áreas de tanques de armazenamento; áreas de tambores enterrados, junto ao limite do terreno da empresa e em horto florestal próximo; além da remoção do prédio da usina.

Todos os resíduos sólidos e solo contaminado, caracterizados como perigosos, foram destinados para aterro de resíduo perigoso ou unidade de incineração, conforme concentração de contaminantes presentes. As áreas escavadas foram protegidas por processos de engenharia, a fim de evitar o contato com as águas de chuvas e minimizando a dispersão de contaminantes na atmosfera. Foram realizados

monitoramento dos diferentes contaminantes de interesse e intervenção para a retirada das principais fontes ativas da área em torno da usina no período de 2012/2013. A continuidade do processo de remediação da área será deliberada pela FEPAM, em conformidade com a licença de operação a ser implementada.

A análise do efeito mutagênico relacionado à presença de compostos orgânicos em amostras de sedimento do rio Taquari foi realizada em quatro pontos de amostragens (Ta032 - 29°48'19.2"S, 51°52'50.2"W; Ta010 - 29°52'23.9"S, 51°43'21.99"W; Ta006 - 29°54'09.7"S, 51°45'05.1"W; Ta004 - 29°55'45.2''S, 51°43'50.4''W), sendo estes nomeados de acordo com as letras iniciais do rio (Ta) seguidos da quilometragem em relação à foz. Dentre estes quatro pontos, encontram-se dois na cidade de Triunfo, um em Taquari e um na cidade de General Câmara. As amostragens foram realizadas antes (30/06/2011, 24/01/12), durante (16/01/13) e após (19/12/13) o processo de remediação do sítio de solo contaminado.

Na última amostragem, além dos pontos do rio principal (Ta032, Ta010, Ta006, Ta004), foi incluída a coleta de amostra de um arroio localizado a montante do ponto crítico que sofre influência diretamente da área industrial, considerado uma das principais rotas de escoamento de contaminantes presentes no solo da área de estudo para o rio Taquari (Costa et al., 2012).

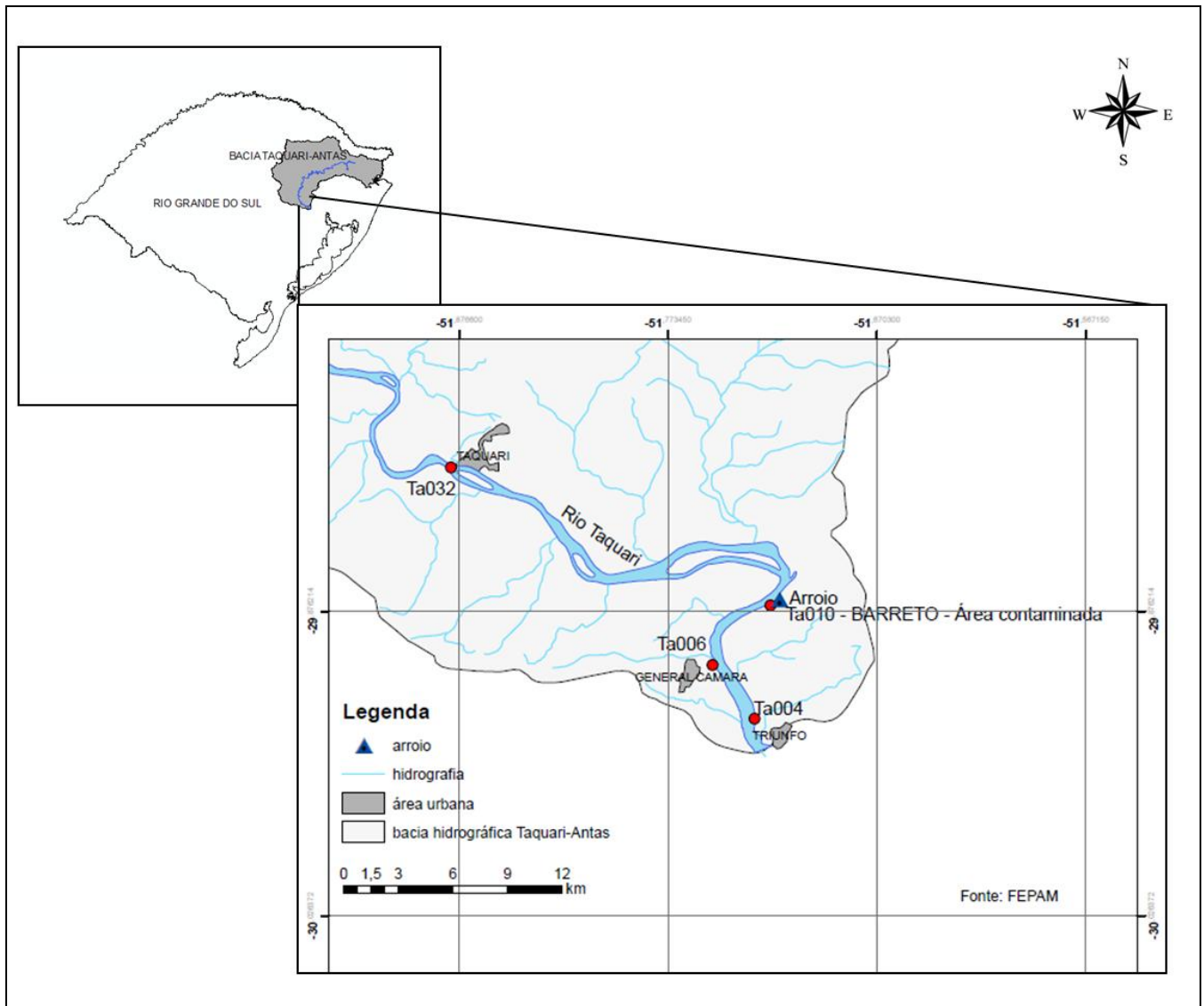


Figura 1. Localização da área de estudo às margens do Rio Taquari e os pontos de amostragens.



Figura 2. Área da usina de preservação de madeira. Fonte: Google.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O presente estudo buscou verificar alterações na qualidade do sedimento do rio Taquari, em área influenciada por processo de remediação de sítio de solo contaminado por preservantes de madeira, utilizando como marcadores teores de HPAs e presença de agentes mutagênicos medidos pelo ensaio *Salmonella*/microsoma.

3.2. Específicos

- ✓ Avaliar a mutagenicidade de extratos orgânicos de sedimento do rio Taquari através do ensaio *Salmonella*/microsoma como parâmetro precoce no diagnóstico da qualidade ambiental;
- ✓ Comparar resultados de mutagenicidade de amostras de extrato orgânico de sedimento do rio Taquari antes, durante e depois do processo de intervenção de sítio de solo contaminado;
- ✓ Relacionar efeito mutagênico com compostos químicos presentes na área.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico “*Atividade mutagênica de sedimento de sub-bacia influenciada por área com solo contaminado em processo de remediação no sul do Brasil*”, a ser submetido à revista *Ecotoxicology and Environmental Safety*, foi desenvolvido a partir dos resultados obtidos neste trabalho.

O trabalho buscou a investigação de possível atividade mutagênica em extratos orgânicos de sedimento do rio Taquari, em área que sofre influência de solo contaminado por preservantes de madeira, durante o processo inicial de remediação do solo, localizado na região nordeste do Rio Grande do Sul, Brasil.

Atividade mutagênica de sedimento de sub-bacia influenciada por área com solo contaminado em processo de remediação no sul do Brasil

Paula Hauber Gameiro ^{a,b}, Naiara Costa Pereira^a, Jocelita Aparecida Vaz Rocha^a, Karen Alam Leal^a, Vera Maria Ferrão Vargas^{a,b*}

^aDepartamento de Pesquisa e Análises Laboratoriais, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM), Av. Salvador França, 1707, 90690-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Departamento de Pesquisas e Análises Laboratoriais, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM), Avenida Salvador França, 1707 CEP: 90690-000, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33346765; fax: +55 51 33346765. ecorisco@fepam.rs.gov.br; verafvargas@gmail.com.

Resumo

A contaminação do solo é uma das fontes pela qual os contaminantes são escoados para os ecossistemas aquáticos, afetando a qualidade dos sedimentos. A região do estudo está localizada em área às margens do rio Taquari, no município de Triunfo-RS, próxima a um sítio com solo contaminado por preservantes de madeira, com rota de contaminantes definida para o rio. A área foi submetida à primeira fase do processo de intervenção para retirada das principais fontes ativas. Para avaliar a qualidade dos sedimentos foi utilizado o ensaio *Salmonella*/microsoma para medir mutagênese além da dosagem de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) nos extratos orgânicos em diferentes fases do processo de intervenção: antes (inverno e verão), durante (verão) e após (verão). As linhagens utilizadas foram TA98, Ta97a e TA100 na presença e ausência de S9mix (\pm S9). A mutagênese foi mais expressiva na linhagem TA100+S9. Os resultados indicaram a presença de pró-mutágenos no ponto Ta010 em todas as amostragens, sendo mais elevada na anterior à intervenção (verão) para TA100+S9 ($1672 \pm 215,9$ rev/g equivalente de sedimento seco) decrescendo durante e após este processo. As amostras deste local apresentaram valores de HPAs totais constantes com presença das espécies de HPAs com potencialidade cancerígena nos diferentes períodos avaliados. O local Ta006 após o período de intervenção foi o que apresentou mutagênese mais expressiva para TA100+S9 ($764 \pm 230,2$ rev/g equivalente de sedimento seco) e, embora não tenha apresentado valores de HPAs mais elevados, as espécies consideradas cancerígenas estiveram em maiores concentrações, em especial o benzo(b+k) fluoranteno, que também se apresentou elevado neste período no local Ta004. Presença de mutagênese e de HPAs em arroio interno a esse sítio, a montante de Ta010, marcaram uma das rotas de dispersão destes agentes. A contaminação presente em frente ao sítio (Ta010), mesmo após a intervenção, pode estar relacionada com a técnica escolhida para retirada das fontes ativas, contribuindo para a presença de contaminantes nos locais a jusante, Ta006 e Ta004.

Palavras-chave: *Salmonella*/microsoma; preservantes de madeira; escoamento de compostos genotóxicos, HPAs, remoção de solo.

1. Introdução

Ecossistemas de água doce, em particular os grandes rios são importantes para o homem, pois apresentam vários usos como transporte, irrigação, recreação, pesca, abastecimento de água industrial e potável (Dolédec & Statzner, 2008). Esses usos têm alterado a integridade ecológica desses recursos hídricos, resultando na fragmentação e desregulação de fluxo, modificações do canal e de bancos de sedimento, além de contribuírem com a poluição de suas matrizes (Jia & Chen, 2013).

As principais fontes de contaminação desses ambientes aquáticos por substâncias genotóxicas são atribuídas aos resíduos industriais e agrícolas, comerciais e domésticos (Houk, 1992; Claxton et al., 1998), ou mesmo a partir de solos contaminados (Costa et al., 2012). A contaminação do solo é um relevante problema ambiental, devido à persistência de muitos poluentes que possuem estabilidade química e alta absorção no solo, o que dificulta sua degradação (Gomes et al., 2014; Islam et al., 2012). Alguns compostos são bioacumuladores e interferem nos fluxos de energia e de nutrientes da cadeia biológica (Haritash & Kaushik, 2009). Dependendo de suas propriedades, muitos desses compostos podem ser escoados para os recursos hídricos contaminando a coluna de água ou, associados às partículas do sedimento, se acumulam em concentrações superiores, gerando efeitos agudos, crônicos e genotóxicos para as comunidades que vivem ou entram em contato com este compartimento (Boldrini et al., 1990; Mozeto, 2004; White & Claxton, 2004).

Na Europa existe uma estimativa de que pode haver até 2,5 milhões de áreas potencialmente contaminadas que necessitam ser investigadas. Destas, aproximadamente 14% (340.000 áreas) já foram identificadas e 15% do total de áreas estimadas já foram remediadas (Liedekerke et al., 2014). No Brasil, não há estimativas quanto ao número de áreas contaminadas, exceto no estado de São Paulo, onde foram

cadastradas até dezembro de 2013, 4.771 áreas contaminadas, das quais 2.674 encontram-se em remediação ou com processo finalizado (CETESB, 2013). A identificação desses sítios auxilia a esclarecer sua contribuição como fonte potencial de contaminação de recursos hídricos.

Muitos dos poluentes genotóxicos e/ou potencialmente carcinogênicos só podem ser detectados após vários anos de exposição, o que destaca a necessidade de ações preventivas (Vargas et al., 1993; Tagliari et al., 2004). Assim a investigação da presença de agentes genotóxicos tem sido empregada como uma das medidas de avaliar a qualidade de recursos hídricos, incluindo a coluna de água e o sedimento. Estes compostos têm sido detectados através de diferentes bioensaios associados a processos adequados de tratamento da amostra (Chen & White, 2004; Ohe et al., 2004; Vargas et al., 1995; Vargas et al., 2008). Um dos ensaios mais utilizado é o *Salmonella*/microsoma que avalia alterações no DNA, através de linhagens de bactérias associadas à homogenatos de células microsomais de ratos (Maron & Ames, 1983) e que vem recebendo modificações que elevam sua sensibilidade (Claxton et al., 2010). Combinado a este teste, deve ser avaliada a citotoxicidade das amostras, pois a morte celular pode mascarar a resposta mutagênica (Vargas et al., 1993). Assim sendo, a utilização destes testes permite o diagnóstico precoce dos recursos hídricos antes que o efeito crônico ou agudo se estabeleça.

Este estudo focaliza as consequências da contaminação de uma área que abrigou nos anos 1960 a 2005 uma usina de preservação de madeira com passivo ambiental já identificado, localizado às margens do rio Taquari. Durante sua atividade a indústria utilizou como preservantes de madeira os compostos pentaclorofenol (PCP), que pode gerar dioxinas; creosoto, formado por HPAs; e arseniato de cobre cromado (CCA), com elevadas potencialidades tóxicas, genotóxicas e carcinogênicas (Appel et al., 2007).

Entre estudos já realizados nesta área, foram detectadas em amostras de solo e poeira domiciliar teores de HPAs, PCP e metais pesados, associados à presença de atividade mutagênica e citotóxica medidas pelo ensaio *Salmonella*/microsoma (Pohren et al., 2012; Coronas et al., 2013). Foi possível também definir rotas desses contaminantes a partir do solo para o rio principal, utilizando os mesmo marcadores químicos em associação ao ensaio *Salmonella*/microsoma detectados neste material drenado (Costa et al., 2012). Como uma provável consequência dessa drenagem foram identificados locais comprometidos com HPAs e resposta mutagênica no sedimento do rio Taquari (Costa et al., 2012). Atualmente a empresa está desativada e incluída nos estudos de impacto ambiental da Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM – órgão ambiental do Estado Rio Grande do Sul, Brasil), sendo que a primeira fase do processo de intervenção do solo já foi realizada com a retirada das principais fontes ativas.

O presente estudo buscou verificar alterações na qualidade do sedimento do rio Taquari, em área influenciada por processo de remediação de sítio de solo contaminado por preservantes de madeira, utilizando como marcadores teores de HPAS e presença de agentes mutagênicos medidos pelo ensaio *Salmonella*/microsoma.

2. Materiais e métodos

2.1. Área de estudo

O estudo foi realizado no Rio Taquari, sub-bacia do Baixo Taquari, pertencente à bacia Taquari-Antas, próximo às margens de área influenciada por sítio de solo contaminado, localizada no distrito de Barreto, município de Triunfo, Rio Grande do Sul, Brasil. Este rio possui aproximadamente uma extensão de 500 km desde sua nascente até a foz. Está situado em uma das regiões mais desenvolvidas do estado, onde se concentra uma grande área antropizada que utiliza suas águas para o abastecimento

público e industrial, agricultura, navegação, recreação, pesca e geração de energia elétrica (Terra et al., 2008).

A área do presente estudo abrigou uma usina de preservação de madeira que iniciou suas atividades em 1960, realizando o tratamento em autoclave, visando exploração, produção, preservação, fabricação de postes de iluminação elétrica e outros produtos derivados de madeira. O terreno em que se localiza a empresa é essencialmente plano, com pequena declividade no sentido oeste-noroeste e percorrido por corpos d'água associados, em direção à drenagem principal, formando sub-bacias. A área industrial foi aterrada com solo da própria região durante a fase de instalação da atividade e essa camada com espessura que varia entre 0,5m e 4m, eleva a porção do terreno em relação à área de entorno. O aquífero, do tipo freático, com profundidades do nível d'água entre 1,6 m e 5,0 m aproximadamente, e apresenta o fluxo subterrâneo com sentido oeste, rumo ao rio Taquari. Junto à área da usina, a elevação do terreno configura um divisor das águas subterrâneas. Devido às suas características, o sítio apresenta alta susceptibilidade quanto ao potencial de contaminação do solo, da água subterrânea e das águas superficiais.

2.2. Intervenção para retirada de fontes ativas

A partir de 2004 foram realizadas investigações para definir a presença de contaminantes no solo, água subterrânea e compartimento atmosférico, identificando dez áreas com fontes ativas de contaminação. O projeto de intervenção junto ao solo, nesses hot spots, foi realizado de 2012 a 2013, incluindo áreas de processo, tratamento, tanques de armazenamento e depósitos de resíduos; áreas de tambores enterrados no terreno da empresa e em horto florestal próximo; além da remoção do prédio da usina.

Os solos e resíduos foram destinados para aterro de resíduos perigosos ou unidade de incineração, conforme concentração e contaminantes presentes. As áreas

escavadas foram protegidas por processos de engenharia, evitando contato com águas de chuvas e minimizando a dispersão de contaminantes na atmosfera. Foram realizados monitoramento dos contaminantes de interesse e intervenção para retirada das principais fontes ativas da área entre 2012 a 2013. A continuidade desse processo será deliberada pela FEPA, em conformidade com licença de operação a ser implementada.

2.3. Pontos de amostragem

Os pontos de amostragem de sedimentos do Rio Taquari foram nomeados de acordo com as letras iniciais do rio (Ta) seguidos da quilometragem em relação à foz (Figura 1). O ponto a montante da área de estudo, Ta032 (29°48'19.2"S; 51°52'50.2"W), está situado na cidade de Taquari; Ta010 (29°52'23.9"S; 51°43'21.99"W), na cidade de Triunfo (Distrito de Barreto) e localizado em frente à área influenciada por sítio contaminado com preservantes de madeira; Ta006 (29°54'09.7"S; 51°45'05.1"W) na cidade de General Câmara; e por último, o ponto Ta004 (29°55'45.2''S; 51°43'50.4''W) na cidade de Triunfo, próximo à foz do rio. Além dos pontos do rio principal foi realizada amostragem em um arroio interno do sítio, a ser denominado como arroio, (29°52'14.19''S; 51°43'6.73''W), com foz situada a montante do ponto Ta010. Este arroio sofre diretamente influência da área industrial, sendo considerada uma das principais rotas de escoamento de contaminantes presentes no solo da área de estudo para o rio Taquari (Costa et al., 2012). Uma relação simplificada das principais fontes de contaminação e usos dos locais estudados está apresentada na tabela 1.

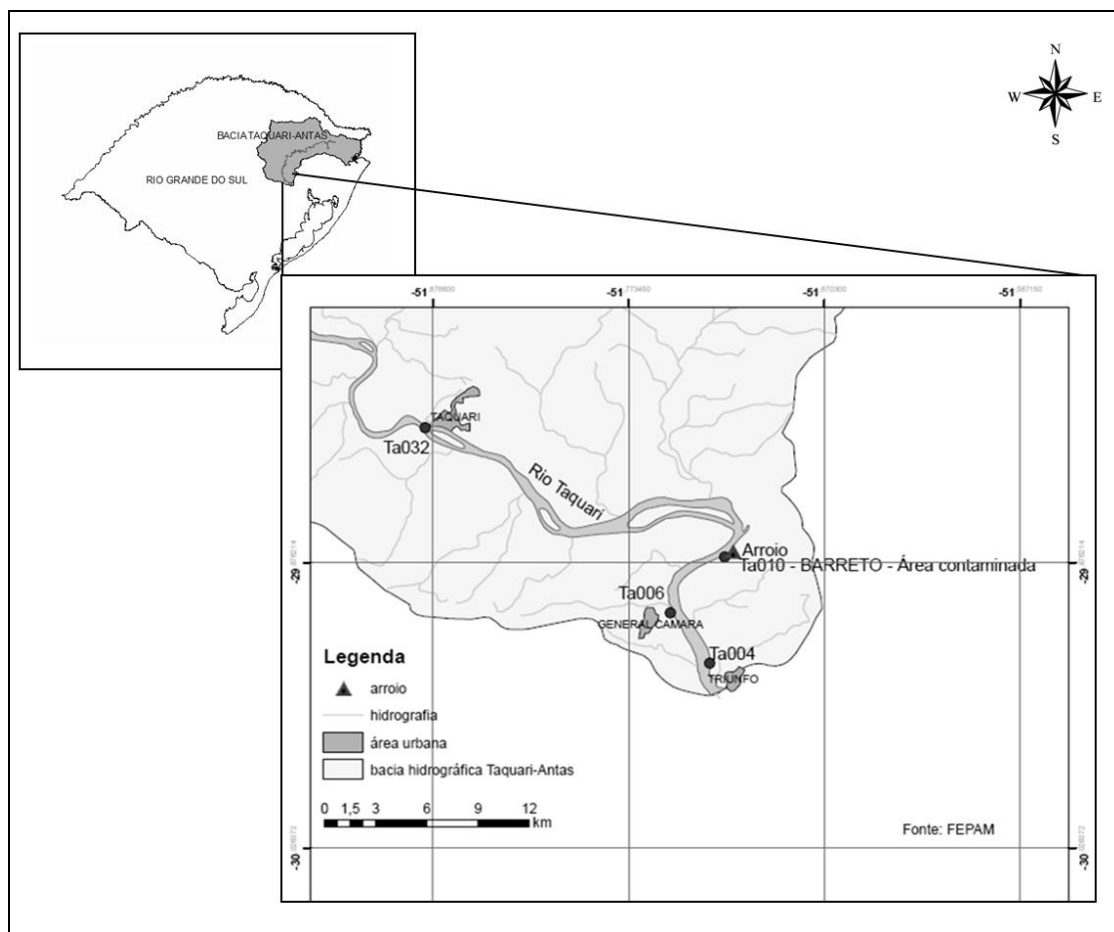


Figura. 1. Localização da Bacia Hidrográfica Taquari-Antas e dos locais de amostragens do Rio Taquari, Ta032, Ta010 Ta006, Ta004 e do Arroio interno do sítio contaminado. Os números mostram a distância em km a partir da foz.

Tabela 1. Relação das possíveis fontes poluidoras e os usos do Rio Taquari nos locais de estudo.

Local	Cidade	Fontes*	Usos
Ta032	Taquari	Esgoto doméstico; curtumes; lixos industriais e domésticos; silvicultura; pecuária; fábrica de artigos de madeira; embarcações, calçados; transporte de produtos perigosos; agroindústria; distribuidora de energia elétrica, atracadouro	Turismo e lazer, pesca, captação de água para abastecimento público, transporte hidroviário, extração de areia e rochas, agricultura irrigada
Ta010	Triunfo	Silvicultura, lixos industriais.	Usina de preservantes de madeira, transporte hidroviário
Ta006**	General Câmara	Silvicultura, fábrica de artigos de madeira e transporte de produtos perigosos	Captação de água para abastecimento público; pesca; transporte hidroviário; irrigação de lavouras de arroz; recreação; extração de areia, cascalho e argila
Ta004	Triunfo	Silvicultura, extração de basalto, lixo hospitalar, lixos industriais, esgoto doméstico, transporte produtos perigosos	Atracadouro, agricultura irrigada, pesca, dragagem de areia, transporte hidroviário.

*Empreendimentos licenciados pela Fepam em 2015.

** local situado na margem direita devido à presença de uma curva do rio Taquari.

2.4. Coleta das amostras

As amostragens de sedimento do rio Taquari foram realizadas antes (30/06/2011, 24/01/12), durante (16/01/13) e após (19/12/13) o processo de remediação do sítio de solo contaminado. As amostras de sedimento foram coletadas de forma composta, por draga de Petersen, a aproximadamente 20 cm do leito do rio (APHA, 1992), acondicionadas em frascos de vidro escuro protegidas da luz e refrigeradas a 4° C até o laboratório. Após, as amostras foram homogeneizadas, subdivididas, armazenadas (em recipientes de vidro), sendo em seguida estocadas em freezer (-20 °C) até a realização das análises. A amostragem do arroio foi realizada apenas na última data de coleta (19/12/13), com a finalidade de verificar a possível presença de contaminantes escoando do solo contaminado da área em estudo para o rio Taquari, como detectado por Costa et al (2012), após o processo de remediação.

2.5. Preparação das amostras

O procedimento de extração dos compostos orgânicos do sedimento descrito por Vargas et al. (2001) foi realizado visando obter frações moderadamente polares com solvente diclorometano (DCM — CASRN 75-09-2), agitadas e sonificadas por 5 min a 100W (50 g da amostra, 100 ml de solvente para cada um de quatro ciclos). Após, os extratos foram pré-filtrados em coluna cromatográfica e concentrados a um volume de 15 ml em rotavapor (40 °C). O volume de 14 ml destes concentrados foi acondicionado em frascos graduados, sendo 1 ml retirado para determinação do material orgânico extraído. Após secagem da amostra em estufa a 100 °C, a massa orgânica extraída (MOE) foi determinada em balança eletrônica analítica de cinco casas decimais. Estes extratos concentrados foram acondicionados à -20 °C até 60 dias. No momento do ensaio, os extratos foram secos com nitrogênio gasoso e ressuspensos com

Dimetilsulfóxido (DMSO—Riedel-de Haën, CASRN 67-68-5), por grau de espectrofotometria.

2.6. Caracterização granulométrica

A granulometria do sedimento consistiu na separação das principais classes textuais dos sedimentos grossos e finos, sendo classificados como cascalhos, areia, silte e argila. Essa classificação foi relativamente constante nos quatro pontos nas diferentes amostragens realizadas (Tabela 2). Os pontos Ta032, Ta010 e Ta004 apresentaram variação apenas em uma estação de coleta. Entretanto, o local Ta006 foi o que mais variou, de areia com cascalho e lama, na primeira amostragem, areia com lama nas intermediárias e lama com areia na última.

2.7. Ensaio *Salmonella*/microsoma

A atividade mutagênica e citotóxica foi avaliada através do método de microsusensão – Teste Kado (Kado et al., 1986) modificado do ensaio *Salmonella*/microsoma (Maron & Ames, 1983; Vargas et al., 1993) em ensaios na presença e ausência de fração microsomal de fígado de rato Sprague Dawley (4%) pré-tratada com AROCLOR 1254 (adquirida na forma liofilizada - Moltox, USA). Foram utilizadas as linhagens TA98 e TA97a, que detectam a ação de mutagênicos que causam erro no quadro de leitura, sendo que esta última é descrita na literatura, além de definir a presença de compostos orgânicos, apresenta sensibilidade a metais pesados (Pagano & Zeiger, 1992); e a linhagem TA100 que caracteriza substituição de pares de bases do DNA (Maron & Ames, 1983). Estudos anteriores mostram a sensibilidade destas linhagens a compostos orgânicos, como HPAs (Coronas et al., 2013; Pohren et al., 2012).

Tabela 2. Classificação granulométrica das amostras do Rio Taquari nas quatro amostragens, antes, durante e após o processo de intervenção.

	Classificação granulométrica pela frequência simples (%)																
	ANTES				DURANTE				APÓS				STREAM				
	Jun/2011		Jan/2012		Jan/2013		Dez/2013										
	Ta032	Ta010	Ta006	Ta004	Ta032	Ta010	Ta006	Ta004	Ta032	Ta010	Ta006	Ta004	Ta032	Ta010	Ta006	Ta004	
CASCALHO	0,81	0,00	30,50	19,40	0,80	0,00	0,00	7,90	0,70	0,00	0,50	13,80	0,00	0,00	0,00	3,70	1,50
AREIA	38,02	11,58	35,93	78,50	30,50	36,60	60,70	84,50	39,90	18,40	72,30	78,70	12,40	22,00	39,90	33,30	61,30
SILTE	45,95	72,47	27,82	2,01	40,50	51,00	32,10	5,80	49,30	68,20	22,70	7,00	68,00	61,20	51,10	47,00	18,10
ARGILA	15,22	15,95	6,20	0,09	28,50	12,50	7,00	1,80	10,10	13,40	4,50	0,40	19,60	16,80	9,00	16,00	19,10
Caracterização	Lama / Areia	Lama	Areia/ cascalho / lama	Areia	Lama / Areia	Lama / Areia	Areia/ lama	Areia	Lama / Areia	Lama / Areia	Areia/ lama	Areia	Lama	Lama / Areia	Lama / Areia	Lama / Areia	Areia/ lama

As concentrações utilizadas nos testes, inicialmente, foram 2,5; 10; 40 e 80 µg equivalente de sedimento seco. Em presença de citotoxicidade nos ensaios foi estabelecida nova curva dose–resposta priorizando a porção linear, não citotóxica da curva para realização dos testes de mutagenicidade. As dosagens ajustadas foram 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 40 e 80 µg equivalente de sedimento seco, sendo a dosagem mais elevada delimitada pela presença de citotoxicidade. As amostras foram incubadas com 100 µl da cultura bacteriana (1×10^{10} céls/ml) na ausência e presença de ativação metabólica (100 µl), por 90 min, no escuro, a 37° C e sem agitação. Após um período de 72 horas de incubação a 37° C, as colônias revertentes foram contadas para estimar a atividade mutagênica. Em todos os ensaios foram utilizados como controles negativos o meio nutriente líquido (utilizado para titulação da cepa – 100 µl) e o solvente utilizado para solubilização das amostras (neste caso, DMSO – 5 µl). Como controles positivos foram utilizados a azida sódica (AZS – CASRN 26628-22-8, Merck do Brasil) e 4-nitroquinoleína-1-óxido (4NQO, CASRN 56-57-5, Sigma Chemical Company) em ensaios sem S9mix, e 2-aminofluoreno (2AF CASRN 153-78-6, Sigma Chemical Company) com S9 mix.

2.8. Análises de dados

A mutagênese das amostras foi calculada pela análise da porção linear da curva dose-resposta. O número de revertentes por placa foi analisado no programa Salanal (Análise de *Salmonella* de Ensaio, a versão 1,0 do Research Triangle Institute, RTP, North Carolina, EUA), considerando a porção da linear da curva dose-resposta, selecionando os modelos de regressão linear ou Bernstein (Bernstein et al., 1982), sendo utilizado modelo Lintox quando este foi configurado como o melhor modelo. A amostra foi considerada mutagênica em presença de significância estatística positiva na análise de regressão e na ANOVA ($p \leq 0,05$), sendo indicativa na presença de um desses

critérios. Os valores positivos foram expressos em revertentes/g equivalentes de sedimento seco. A atividade citotóxica foi avaliada através da curva de sobrevivência do organismo teste comparada as diferentes concentrações de amostras após 72 horas de incubação. Esta foi considerada positiva quando a porcentagem de células sobreviventes for inferior a 60% das colônias comparadas ao controle negativo (Vargas et al., 1993).

2.9. Análise química

Os extratos orgânicos de sedimento foram obtidos através da extração baseada no método 3550C recomendado pela Agência de Proteção ambiental dos Estados Unidos (USEPA) (USEPA, 2008), com referência a metodologias distintas para análise de HPAs no solo, considerando a presença de baixas ou altas concentrações. Foram analisados os dezesseis HPAs considerados prioritários pela Agência de Proteção ambiental dos Estados Unidos (ATSDR, 2008): naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(ghi)perileno.

A metodologia escolhida para extração dos HPAs nos extratos orgânicos de sedimento considerou que as amostras apresentaram uma quantidade relativamente alta de HPAs em estudos anteriores (Costa et al., 2012). Dessa forma, foram utilizadas 2 g de amostra seca em sulfato de sódio (Na_2SO_4) e o solvente Diclorometano (DCM) foi adicionado para ultrassonificar às amostras por três minutos. Após este tempo, as amostras foram filtradas e seus volumes foram reduzidos com N_2 gasoso. Assim, o *cleanup* foi realizado nos extratos de sedimento utilizando uma coluna de sílica gel (CASNR 112926-00-8, VETEC) e quatro solventes com diferentes polaridades: 1ª Fração: 20 mL de hexano (CASNR 110-54-3, MERCK) (alifáticos); 2ª Fração: 10 mL de hexano + 10 mL de diclorometano (HPAs); 3ª Fração: 15 mL de hexano + 5 mL de

diclorometano (HPAs); 4ª Fração: 20 mL de diclorometano (nitro-HPAs). Dessas várias frações realizadas, foram analisadas apenas a segunda e a terceira fração, reunidas, devido aos compostos de interesse do trabalho. Por fim o volume foi reduzido a 1 mL e os extratos foram analisados pela cromatografia gasosa conectada a um espectrofotômetro de massa (USEPA para 13-A), usando a padronização externa. Estas análises foram realizadas pelo Laboratório de Química da FEPAM, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

3. Resultados e discussões

Estudos realizados no sedimento do rio Taquari, tanto anteriores como atuais permitiram avaliar a presença de contaminantes, ajudaram a definir possíveis compostos que contribuíram para formação de misturas complexas perigosas e identificaram rotas de dispersão desses contaminantes (Costa et al., 2012). A fase atual da pesquisa avaliou a área de interesse no período de intervenção realizada para retirada das principais fontes, analisando a possível remobilização de contaminantes. Para avaliar este comportamento, a presença e efeito de poluentes mutagênicos foram analisados pelo ensaio *Salmonella*/microsoma em extratos orgânicos do sedimento nos quatro locais do rio Taquari, em diferentes etapas de remediação: antes (na estação de inverno e verão), durante e depois do processo (no verão). Ainda, foi avaliado arroio que recebe influência da área industrial, sendo definido em estudos prévios (Costa et al., 2012) como uma via de contaminação para o rio Taquari.

A citotoxicidade foi um fator muito presente nos extratos orgânicos de sedimento das diferentes amostragens, tanto em ensaios na presença quanto ausência de metabolização. Observando os resultados da figura 2 foi possível verificar que os extratos apresentaram maior citotoxicidade nos ensaios em ausência de S9 mix. Dos locais amostrados no rio o Ta006 foi o mais representativo, com amostras citotóxicas

em quase todos os períodos. Após o procedimento de remediação foi detectada citotoxicidade nos três pontos de possível influência da área contaminada e no arroio que drena a área interna do empreendimento recebendo contaminantes do solo. A presença de citotoxicidade também foi encontrada em estudo anterior (Costa et al., 2012) nos locais Ta010 e Ta006, além do arroio. Respostas não citotóxicas foram encontradas uma vez no local à montante, Ta032. Na área de influencia do sítio contaminado, também foi observada esta ação nos pontos Ta010 (antes da remediação – verão), Ta006 (antes da remediação – inverno) e no Ta004 nas duas amostragens do período anterior à intervenção. Nos ensaios realizados em presença de S9 mix, as respostas citotóxicas estiveram presentes nos locais Ta010 e Ta006 em períodos anteriores e posteriores à intervenção da área, além de valores limites observados em Ta004, durante e após a remediação. As análises do arroio confirmaram esta ação citotóxica.

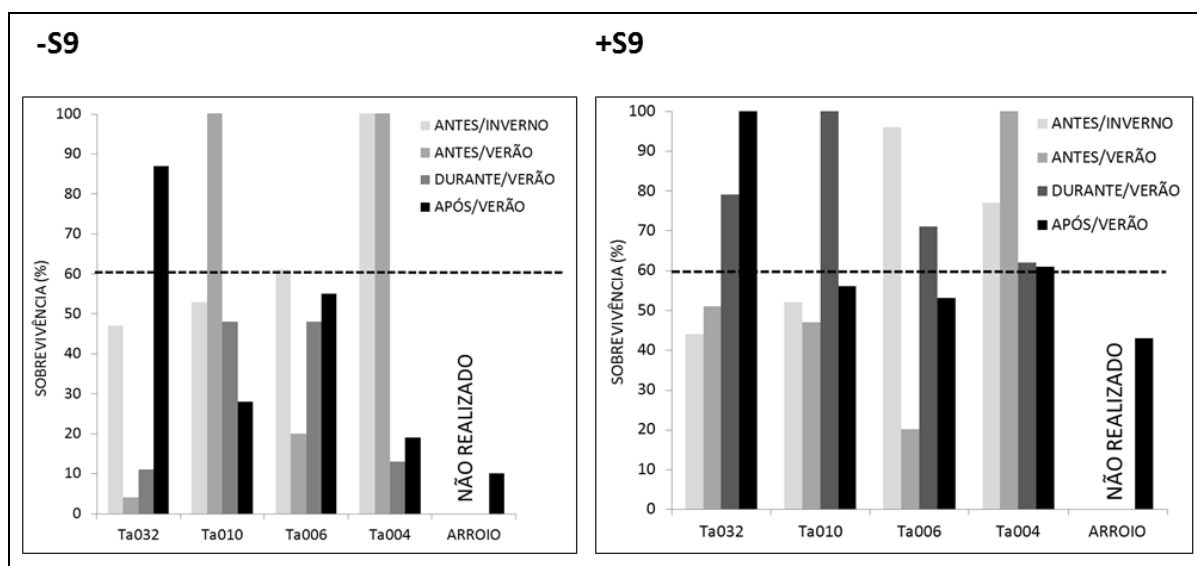


Figura. 2. Porcentagem de células sobreviventes no ensaio *Salmonella*/microsoma avaliando extratos orgânicos de sedimento em quatro amostragens, antes, durante e após o processo de intervenção. Os valores abaixo de 60% (linha pontilhada) indicam citotoxicidade. Para o cálculo da porcentagem foram considerados os seguintes valores: amostras não citotóxicas - a última dosagem utilizada (80 µg de sedimento seco); e amostras citotóxicas - a menor dosagem citotóxica; Ta010 - local em frente ao sítio de solo contaminado; arroio interno do sítio contaminado.

A tabela 3 mostra os resultados de mutagênese dos extratos orgânicos dessas amostras pelo método de micro-suspensão utilizando as linhagens TA98, TA97a e TA100, na presença e ausência de ativação metabólica. Nas curvas dose-resposta foram consideradas as dosagens com crescimento celular superior a 60%. A primeira dosagem citotóxica de cada condição de ensaio para os diferentes locais está também mostrada na tabela 3.

Tabela 3. Respostas Mutagênicas e citotóxicas de extratos orgânicos de sedimento (revertentes/g equivalentes de sedimento seco) na presença e ausência de S9 mix em quatro locais de amostragem no Rio Taquari, antes, durante e após o processo de intervenção.

	Área/Amostragem	TA98		TA97a		TA100		^a Citotoxicidade		
		-S9 mix	+S9 mix	-S9 mix	+S9 mix	-S9 mix	+S9 mix	-S9 mix	+S9 mix	
30/06/2011	Antes	Extrato Org. Ta032	ns ^b	ns	ns	ns	ns	ns	80	40
		Extrato Org. Ta010	ns	i ^c	ns	125±52,3	ns	ns	80	80
		Extrato Org. Ta006	ns	ns	ns	ns	ns	ns	- ^d	-
		Extrato Org. Ta004	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	-	-
24/01/2012	Antes	Extrato Org. Ta032	ns	ns	373±88,3	ns	ns	ns	20	40
		Extrato Org. Ta010	ns	ns	53±9,0	67±19,8	ns	1672±215,9	-	80
		Extrato Org. Ta006	ns	ns	58±19,7 ^e	ns	ns	ns	20	40
		Extrato Org. Ta004	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-	-
16/01/2013	Durante	Extrato Org. Ta032	ns	33±5,4	ns	ns	87±23,6	i	80	-
		Extrato Org. Ta010	ns	i	ns	ns	ns	83±23,6	15	-
		Extrato Org. Ta006	ns	ns	ns	ns	ns	ns	20	-
		Extrato Org. Ta004	ns	ns	ns	ns	ns	ns	80	-
18/12/2013	Após	Extrato Org. Ta032	ns	ns	ns	23±7,2	ns	ns	-	-
		Extrato Org. Ta010	ns	ns	ns	81±46,9	ns	ns	10	80
		Extrato Org. Ta006	ns	ns	ns	ns	350±86,6	764±230,2	20	7,5
		Extrato Org. Ta004	ns	132±17,8	ns	ns	ns	ns	15	-
		Extrato Org. Arroio	ns	ns	ns	297±34,5	ns	136±21,6	40	80

Controle Negativo (rev/placa± desvio padrão) – Extrato orgânico, (5 µL DMSO/placa) –S9 mix: 37 ± 12,8 (TA98), 129 ± 54,4 (TA97a), 183 ± 59,5 (TA100); +S9 mix: 39 ± 13,9 (TA98), 189 ± 101,1 (TA97a), 174 ± 62,0 (TA100); Controle Positivo – S9 mix: 4NQO (0,5µg/placa) 228 ± 150,9 (TA98), 636 ± 272,23 (TA97a) e AZS (5µg/placa) 699 ± 554,7 (TA100); +S9 mix: 2AF (10µg/placa) 174,2 ± 70,3 (TA98), 194,9 ± 99,9 (TA97a) e 292,1 ± 279,7 (TA100). ^aprimeira dosagem citotóxica (µg de sedimento seco) com sobrevivência celular menor do que 60% comparada com controle negativo; ^bns, não significativo, ^cvalores indicativos de mutagenicidade ; ^dnão citotóxica; ^e considerado modelo Lintox2. As respostas apresentaram significância para ANOVA (p<0,05) e efeito dose-resposta positiva (p<0,05), de acordo com o programa Salanal.

O local à montante da área influenciada pelo sítio contaminado, Ta032, apresentou atividade mutagênica em três das quatro amostragens realizadas. Foi caracterizada a presença de mutágenos do tipo erro no quadro de leitura (TA97a-S9;+S9 e TA98+S9) e substituição de pares de bases (TA100-S9; +S9). Os valores variaram de negativos a $373\pm 88,3$ revertentes/g equivalente de sedimento seco (TA97a-S9), caracterizando que este local a 22 km à montante da área de principal interesse do presente estudo, recebe contribuições antrópicas importantes (Tabela 1). No ponto mais crítico, em frente ao sítio contaminado, Ta010, foram observados resultados significativos nos diferentes períodos do estudo e linhagens analisadas, sendo seis positivos e dois indicativos.

Das respostas positivas, apenas uma foi observada para mutagênese direta (TA97a-S9, no período de verão antes da intervenção). Os valores detectados para pró-mutágenos variaram de $67\pm 19,8$ revertentes/g equivalentes de sedimento seco (TA97a+S9) até $1672\pm 215,9$ revertentes/g equivalente de sedimento seco nos ensaios com TA100 (ambos no período de verão antes da intervenção). No ponto Ta006, o qual apresentou os valores de citotoxicidade mais elevados, os resultados para mutagênese foram verificados na etapa antes da remediação (verão) para danos no quadro de leitura (TA97a) com mutação direta; e após remediação para mutações de substituição de pares de bases (TA100-S9 e +S9), sendo mais elevados em presença de metabolização ($764\pm 230,2$ revertentes/g equivalentes de sedimento seco). No local mais a jusante, Ta004, apenas foi encontrada atividade mutagênica com danos de erro no quadro de leitura (TA98+S9) após a intervenção ($132\pm 17,8$ revertentes/g equivalentes de sedimento seco).

Os resultados obtidos para o arroio que drena a área interna do sítio, analisados na etapa após intervenção, mostraram atividade mutagênica através das linhagens que

detectam erro no quadro de leitura (TA97a) e substituição de pares de bases (TA100) ambas na presença de S9 mix. Sendo assim, foi possível verificar a presença de contaminantes neste local, provavelmente liberados por escoamento superficial do solo da área contaminada após episódios de chuva (Costa et al., 2012), explicando parte da contaminação observada.

A figura 3 resume as análises do potencial mutagênico verificado pelo ensaio *Salmonella*/microsoma para os extratos orgânicos de sedimento através da soma das três linhagens utilizadas para detectar diferentes grupos de contaminantes. Esta figura mostra os resultados nos diferentes tratamentos de amostra, na presença e ausência de S9, de forma combinada (3a) e separada (3b e 3c). É possível perceber que a maioria dos resultados obtidos foi na presença de ativação metabólica (Figura 3a e 3c). A figura 3a mostra que dentre os pontos analisados, o Ta010 foi o que apresentou maior diversidade de classes de mutagênicos, antes da intervenção, indicando contaminação de uma mistura de diferentes compostos orgânicos. Esta evidência foi reduzida após a intervenção realizada na área contaminada. Porém, resultados significativos persistiram de forma reduzida, provavelmente devido à influência do arroio que drena a área contaminada, onde os padrões de mutagenicidade encontrados foram semelhantes, marcando uma rota de dispersão desses contaminantes.

Uma mudança no padrão de mutagênese foi verificada no local Ta006. Nos períodos antes e durante o processo de intervenção foram observadas respostas negativas a baixas enquanto após o processo houve uma elevação na atividade mutagênica. Estes últimos valores de mutagênese foram mais elevados do que os detectados na área Ta010. Essa diferença dos padrões de mutagênese encontrada tanto no ponto Ta010 quanto no Ta006 estão relacionadas à linhagem TA100+S9, indicando que pode estar havendo um deslocamento de substâncias presentes no ponto mais crítico

(Ta010), que induzem substituição de pares de bases, para o local à jusante (Ta006) após o processo de intervenção. No estudo já realizado nesses locais (Costa et al., 2012), foram observadas respostas significativas em TA98+S9, sendo que em Ta006 os valores de mutagenese estiveram mais elevados do que na área Ta010.

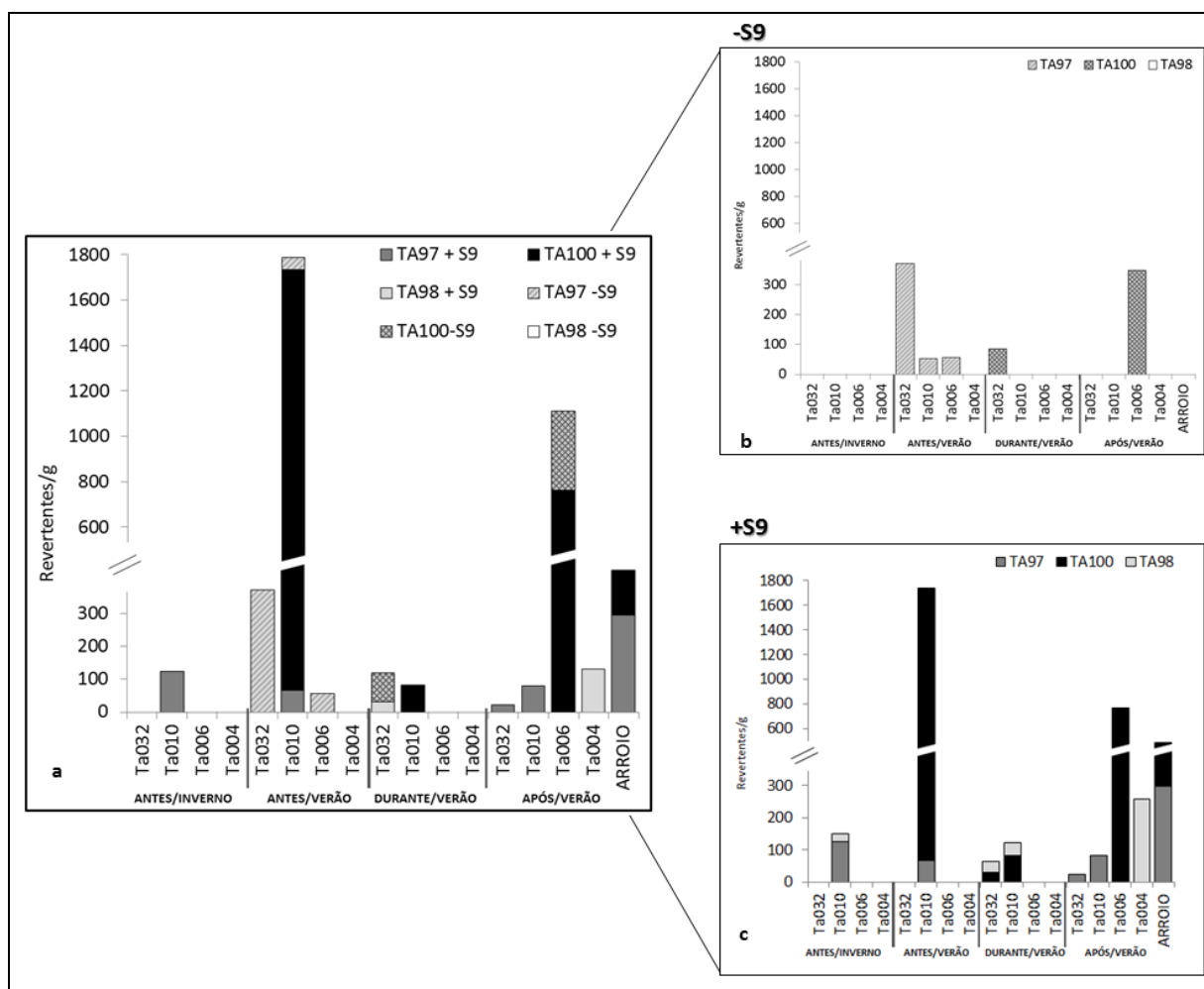


Figura. 3. a - Potência mutagênica em revertentes por grama seca equivalente de sedimento seco expressa pela soma total das linhagens que detectam mutágenos que causam danos por erro no quadro de leitura (TA98 e TA97a) e substituição de pares de bases (TA100), na ausência (-S9) e presença (+S9) de ativação metabólica nos diferentes locais e amostragens; b - somatório das respostas -S9; c-somatório das respostas +S9; Ta010 local em frente ao sítio de solo contaminado.

Deve ser considerada a granulometria desses locais, caracterizada pela presença de partículas finas (Tabela 2). Muitos poluentes aquáticos são predominantemente associados a esses fragmentos de sedimento ricos em matéria orgânica. O descarte de

resíduos no ambiente, a biodisponibilidade e toxicidade destes poluentes, especialmente com substâncias orgânicas semi voláteis, são determinados pela interação com esses grânulos (Chen & White, 2004). Assim, a deposição de partículas finas pode ocorrer a partir do local Ta010 para o Ta006 (Costa et al., 2012), principalmente após o período de intervenção, onde o solo da área contaminada foi revolvido. Outras fontes de contaminação também devem ser consideradas para o local Ta006, como a agricultura, com a presença de lavouras de arroz, além das empresas de extração de areia (Tabela 1). Essas últimas podem contribuir com uma variabilidade de respostas mutagênicas, de menor ou maior elevação, devido à característica conservativa do sedimento que pode ser revolto quando sofre ação da retirada da areia, permitindo que os contaminantes sejam remobilizados para a coluna de água (Gomes et al., 2000).

O local a montante da área contaminada, Ta032, apenas não apresentou respostas mutagênicas na primeira amostragem de inverno. Dentre os valores observados, os mais elevados foram para TA97a, que detecta danos de erro do quadro de leitura, em ensaios com ação direta (-S9). A contaminação neste local já foi observada anteriormente por Costa et al., (2012), mostrando um histórico de enriquecimento, porém com agentes de natureza diversa daqueles encontrados nos locais influenciados pela área contaminada. O ponto Ta004 foi o que apresentou menor número de respostas significativas, sendo encontrada apenas na amostragem após a intervenção, mas em valores expressivos. Esse resultado pode ser relacionado à granulometria que foi alterada, de areia para partículas finas (Tabela 02), uma vez que muitos poluentes se aderem a essa parcela do sedimento.

A presença de compostos tóxicos e genotóxicos no local contaminado foi também observada em estudos anteriores (Costa et al., 2012; Pohren et al., 2012). Na mistura complexa de compostos orgânicos esperada no local estão os HPAs,

provavelmente originados pelo creosoto. A predominância de respostas significativas para mutagenicidade em presença de metabolização elevam as evidências quanto à ação dos HPAs, pois estes atuam principalmente como pró-mutágenos (Courty et al., 2008; Watanabe et al., 2008) e já foram detectados em estudos anteriores (Costa et al., 2012). Oito dos dezesseis HPAs analisados (neste caso 7, pois dois compostos foram agrupados) são classificados pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC, 2010) como grupo 1 (cancerígeno para o homem: benzo(a)pireno), grupo 2A (provavelmente cancerígeno para o homem: dibenzo(ah) antraceno) ou grupo 2B (possivelmente cancerígeno para o homem: naftaleno, benzo(a) antraceno, criseno, benzo(b+k)fluoranteno, indeno(1,2,3-cd) pireno). No presente estudo, estes sete HPAs foram expressos nos resultados como carcinogênicos e acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno e benzo(ghi)perileno foram expressos como outros HPAs. A soma das concentrações desses compostos nas quatro amostragens é apresentada na figura 4. Os valores dos HPAs totais mostraram uma maior evidência no período após o processo de intervenção do solo contaminado, em todos os pontos de amostragem. Dentre eles, o Ta010 mostrou teores mais elevados de HPAs em todos os períodos, sendo que após o procedimento foram os mais altos (0,91 µg/g), incluindo a predominância daqueles que são considerados cancerígenos ao homem. Os resultados observados para o arroio (1,2 µg/g) indicaram que este pode estar contribuindo para a contaminação do local Ta010. Nos locais Ta006 e Ta004 foram encontrados teores de HPAs totais menores nas amostragens anteriores e durante o tratamento, porém, na maioria delas, as concentrações de HPAs carcinogênicos foram maiores que os outros HPAs. Essas respostas elevadas também estiveram presentes em estudos anteriores, no Ta006 (Costa et al., 2012), mostrando valores até maiores que o

ponto crítico, Ta010. No local a montante Ta032, os teores encontrados para HPAs indicaram que está ocorrendo contaminação por fonte diversa.

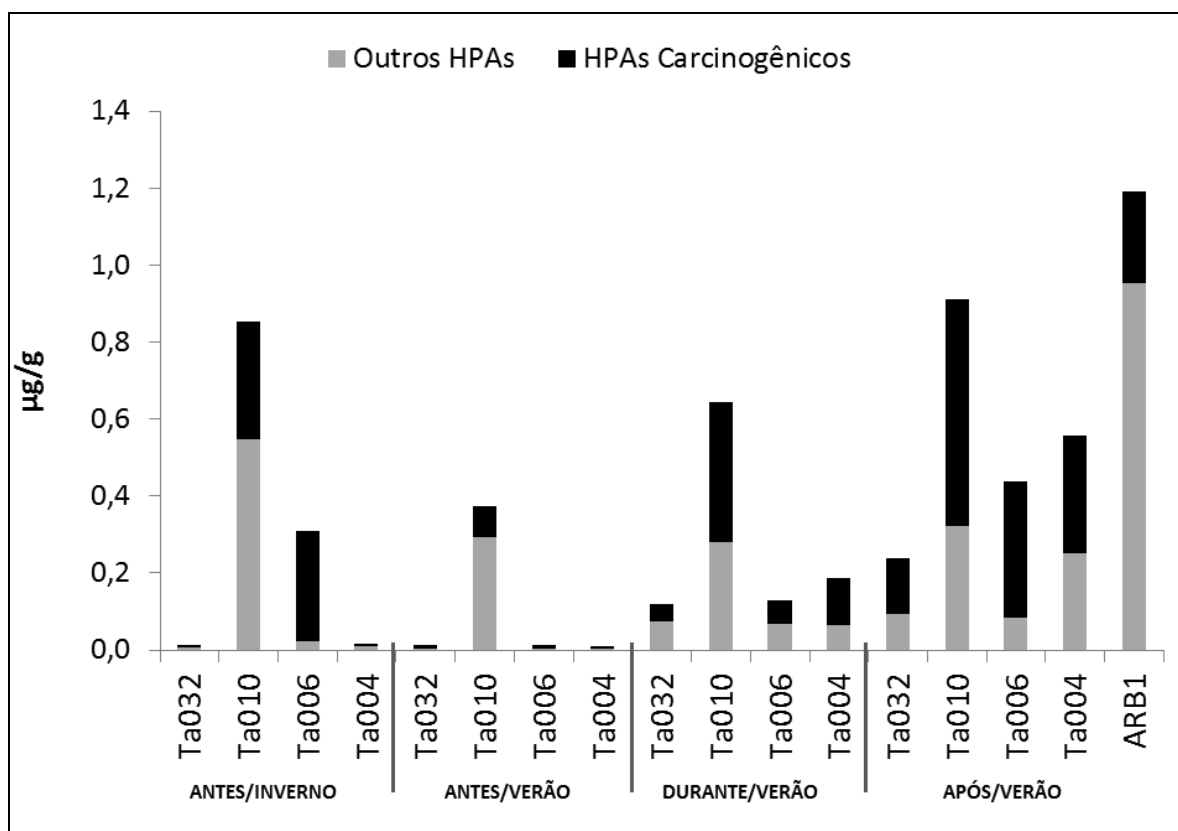


Figura. 4. Concentração Total de HPAs enfatizando a soma dos HPAs potencialmente carcinogênicos (Grupo 1: Carcinogênicos aos humanos; Grupo 2A: Provavelmente carcinogênicos aos humanos; Grupo 2B: Possivelmente carcinogênico aos humanos) e Outros HPAs: espécies consideradas não carcinogênicas em amostras de extrato orgânico de sedimentos, nas quatro amostragens: antes, durante e após o processo de intervenção.

Respostas observadas para HPAs com potencial cancerígeno permitiu criar um perfil de contaminação (Figura 5). Os dois compostos com concentrações mais elevadas foram: o benzo(b+k)fluoranteno presente nos locais Ta006 (0,2 µg/g) e Ta004 (0,2 µg/g) após a intervenção do solo contaminado, Indeno(123cd)pireno no Ta010 nas amostragens de inverno antes e de verão, após a intervenção. O benzo(a)pireno, considerado HPA do grupo 1 (carcinogênico ao homem) foi encontrado nos locais Ta010, em todas estações; Ta006, após a intervenção, sendo a maior concentração

observada (0,05 $\mu\text{g/g}$ equivalente de sedimento seco); Ta004 durante e após o procedimento e no Ta032 também após a intervenção.

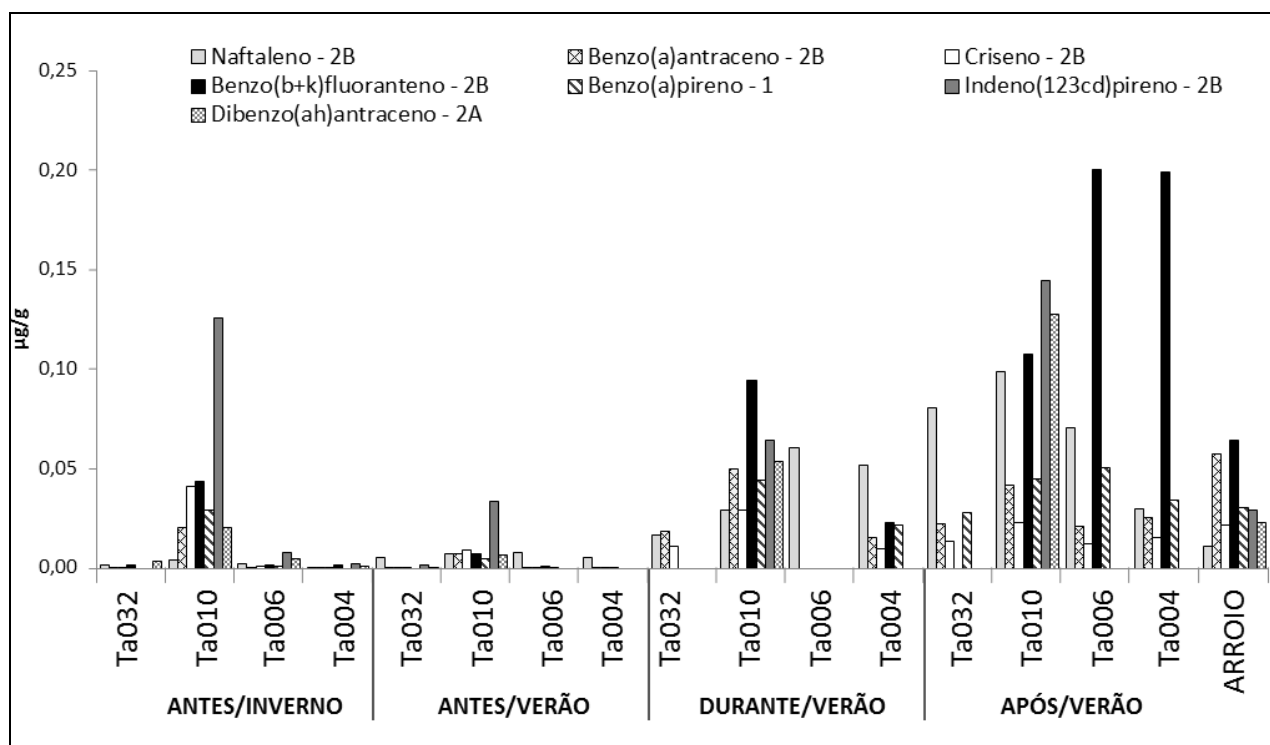


Figura. 5. Concentração dos HPAs potencialmente cancerígenos (Grupo1: Carcigênicos aos humanos; Grupo 2A: Provavelmente carcinogênicos aos humanos; Grupo 2B: Possivelmente carcinogênico aos humanos); avaliados nos extratos orgânicos de sedimentos, nas quatro amostragens do processo de intervenção.

Os HPAs são considerados mutagênicos e requerem a presença de ativação metabólica para mostrar o seu efeito (Courty et al., 2008; Watanabe et al., 2005, 2008). Embora considerados não carcinogênicos para o homem, os outros HPAs também podem explicar as respostas citotóxicas e/ou mutagênicas observadas, como o pireno (Ta004), antraceno e fenantreno (ambos no Ta010) encontrados em maiores concentrações neste grupo de HPAs, após o processo de intervenção da área contaminada. As linhagens mais sensíveis para estes compostos são a TA98, que detecta erros no quadro de leitura e TA100, substituição de pares de bases associadas a fração S9 mix. Contudo, foram observados pró-mutágenos também através das linhagens TA97a, que detecta erros no quadro de leitura. Entre a três linhagens a TA100, apresentou respostas mais elevadas de mutagenicidade. Chen & White, (2004) em

revisão da literatura, apontou relação da atividade mutagênica com a concentração HPAs revelando que 70% da mutagenicidade por substituição de pares de bases é ocasionada pela presença de HPAs. No entanto, é importante destacar que a mutagênese observada é o resultado da ação de uma mistura complexa de substâncias, onde o efeito dos HPAs pode ser devido a ações adicionais causados por outros compostos e até mesmo daqueles com efeitos sinérgicos (Maertens et al., 2008).

O pentaclorofenol, preservante de madeira utilizado na área durante a atividade da usina, embora não mutagênico, apresenta efeito sinérgico (Gichner et al., 1998). Porém este composto orgânico esteve abaixo do limite de detecção nas amostras de sedimento deste rio em estudos anteriores (Costa et al., 2012). No entanto, sua presença foi detectada nas amostras do arroio investigado com valores mais altos do que os estabelecidos pela legislação para prevenção de solos no Brasil (Brasil, 2009; Costa et al., 2012) e em amostras de poeira da área residencial da região do presente estudo (Coronas et al., 2013). Sua presença mesmo em níveis basais pode contribuir para a mutagênese observada (Pohren et al, 2012).

Resíduos de metais em decorrência do CCA (cromo, cobre e arsênio), embora não sejam o foco principal do estudo, podem estar refletindo respostas observadas em TA97a, linhagem mais sensível a este grupo de compostos, a partir de possível presença de orgão metálicos. No entanto, estudos anteriores indicam que a contaminação por metais, nesta área, está mais restrita ao sítio contaminado, com concentrações no sedimento dentro dos níveis previstos em legislação (Costa et al., 2012). As respostas significativas associadas a esta linhagem foram encontradas nos pontos sob influência da área contaminada (Ta010 e Ta006), além do local à montante (Ta032).

A citotoxicidade detectada, principalmente nos locais de influência do sítio contaminado, Ta010 e Ta006, também foi observada por Costa et al. (2012). A presença

desta característica de maneira constante nas frações de sedimentos é uma indicação de que este compartimento ambiental está acumulando e reprocessando substâncias químicas (Vargas et al., 2001), podendo alterar a dinâmica do ecossistema.

Os resultados obtidos para atividade mutagênica, avaliados nas concentrações não citotóxicas, de uma maneira geral, apresentaram valores mais representativos para linhagem TA100, principalmente associados ao sistema de metabolização (S9). Na revisão de Chen & White (2004), foi realizada uma análise dos dados de estudos, em diversos países, que estudaram este compartimento utilizando o teste de Ames com as linhagens TA98 e TA100, na presença e ausência de S9, classificando as áreas em remotas, urbanas/industriais e altamente contaminadas. Para efeito de comparação, os resultados encontrados do presente estudo consideraram também os valores observados para TA97a. Assim, as amostras de sedimento do local Ta010, antes e depois do processo de intervenção, indicaram uma alteração de classificação, de área altamente contaminada, no período anterior, com potência mutagênica de $1672 \pm 215,9$ rev/g equivalente de sedimento seco (TA100), para urbana/industrial ($81 \pm 46,9$ rev/g equivalente de sedimento seco, TA97a). Contudo, o aumento das respostas positivas encontradas nas amostras de sedimento em Ta006, após a intervenção, permitiu classificar este local como altamente contaminado ($764 \pm 230,2$ rev/g equivalente de sedimento seco) com valores duas vezes mais elevados do que áreas urbanas/industrializadas. Os locais a montante e a jusante apresentaram classificação entre áreas remotas e urbanas/industrializadas para as linhagens TA97a+S9 (Ta032, $23 \pm 7,2$ rev/g equivalente de sedimento seco) e TA100+S9 (Ta004, $132 \pm 17,8$ rev/g equivalente de sedimento seco).

A avaliação da qualidade dos sedimentos, em programas de monitoramento ambiental, utiliza critérios em função das concentrações de contaminantes, com vistas à

proteção da vida aquática, baseado em valores-guia, estabelecidos pelo Conselho Canadense de Ministros do Meio Ambiente (CCME, 2002) para diferentes compostos. Estes valores-guia foram adotados pela resolução CONAMA 344/04 (Brasil, 2004) que estabelecem diretrizes e procedimentos mínimos para a avaliação de material dragado. Baseados na probabilidade de ocorrência de efeito deletério sobre a biota, o menor limite – TEL (Threshold Effect Level) ou ISQG (Interim Sediment Quality Guidelines) – representam a concentração abaixo da qual raramente são esperados efeitos adversos para os organismos e o maior limite – PEL (Probable Effect Level) representa a concentração acima da qual é frequentemente esperado o citado efeito adverso para os organismos. Na faixa entre ISQG e PEL situam-se os valores onde ocasionalmente esperam-se tais efeitos (CCME, 2002; CETESB, 2006). A legislação canadense (CCME, 2002) estabelece valores-guia para doze HPAs, dos dezesseis considerados prioritários pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC).

A concentração dos HPAs encontrada neste trabalho foi comparada aos valores-guia desta legislação, relacionada com as potências mutagênicas de cada local amostrado nas diferentes fases de intervenção da área contaminada (Tabela 4). Os resultados mostraram que os valores, entre ISQG e PEL foram observados para oito HPAs encontrados no rio Taquari, dentre eles: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, fluoranteno, pireno e dibenzo(ah)antraceno.

Dos HPAs provavelmente cancerígenos para o homem, apenas o naftaleno e dibenzo(ah)antraceno apresentaram valores que podem ocasionar efeitos para os organismos, preponderantemente nos períodos durante e após a intervenção. O local Ta010 apresentou valores entre ISQG e PEL nas diferentes amostragens, sendo também mais expressivos durante e após a intervenção. Estes valores ainda se intensificaram progressivamente nos locais a jusante da área contaminada, Ta006 e Ta004 nestes

períodos. A potência mutagênica elevada no local Ta006 (1114 rev/g equivalente de sedimento seco) após o processo poderia ser explicada através dos altos valores de HPAs provavelmente cancerígenos. No arroio também foi possível notar um grande número de compostos com valores entre ISQG e PEL, sendo que para acenafteno foram observados teores maiores do que PEL, concentração acima da qual é esperado danos aos organismos. Devem ser referidos os valores elevados de potencial mutagênico observados no local Ta010 antes do período de intervenção, no verão, com valores-guia dentro dos limites de ISQG, com exceção do fluoranteno. Da mesma forma, amostras com potências mutagênicas menores (Ta010 durante e após o processo) apresentaram vários HPAs em concentrações que podem causar prováveis efeitos à biota.

Estas observações salientam a importância da utilização de ensaios biológicos combinados às análises químicas no diagnóstico da qualidade de ecossistemas auxiliando na identificação dos riscos associados a áreas impactadas. Os extratos avaliados se constituem em misturas complexas de compostos orgânicos e apenas alguns destes de forma isolada compõem estes valores-guias. A adoção desses valores teve caráter meramente orientador na busca de evidências da presença de contaminantes em concentrações capazes de causar efeitos deletérios, sobretudo com relação à toxicidade para a biota. No entanto, foi expressivo o decréscimo da qualidade dos locais estudados nos períodos mais críticos do processo.

Tabela 4. Concentração de doze HPAs avaliados em extratos orgânicos de sedimento do Rio Taquari nas quatro amostragens do processo de intervenção comparadas com os valores-guia (CCME, 2002) adotados pela legislação brasileira (Brasil, 2004) que estabelecem diretrizes e procedimentos mínimos para a avaliação de material dragado e comparação com a potência mutagênica observada.

HPAs (µg/Kg)	Valores-guia		ANTES INVERNO				ANTES/VERÃO				DURANTE/VERÃO				APÓS/VERÃO				ARROIO
	ISQG	PEL	Ta032	Ta010	Ta006	Ta004	Ta032	Ta010	Ta006	Ta004	Ta032	Ta010	Ta006	Ta004	Ta032	Ta010	Ta006	Ta004	
<i>Naftaleno</i>	34,6	391	1,7	4,4	2,5	0,5	5,8	7,7	8	5,6	16,7	29,5	60,6	52,0	29,8	71,1	99,0	80,9	11,0
Acenaftileno	5,87	128		1	0,9	0,4	0,4	0,8	0,6	0,6	12,5	17,9	12,3	10,9	18,4	14,8	23,0	16,5	56,0
Acenafteno	6,71	88,9	0,5	12,4	1,4	0,2	0,2	4,9	0,4	0,2	12,5	20,5	11,6	10,3	-	-	20,0	15,7	100,5
Fluoreno	21,2	144	0,9	16,4	0,8	2,5	0,6	10,2	1,4	0,9	11,8	20,5	11,0	10,3	14,9	14,1	22,0	15,7	101,6
Fenantreno	86,7	544	0,7	96,7	2,4	2,9	0,6	70,2	1,5	0,4	12,5	43,8	11,6	10,9	17,5	15,6	35,0	17,4	306,0
Antraceno	46,9	245	0,6	5,4	0,4	0,6	0,1	14,2	0,3	0,1	-	25,0	-	0,0	17,5	10,2	46,0	0,0	145,7
Fluoranteno	113	1494	1,2	265,2	4,4	1,8	0,8	150,3	1	0,7	13,2	62,5	11,0	10,9	17,5	14,8	31,0	15,7	126,1
Pireno	153	1398	0,4	54,1	0,6	0,7	0,2	15	0,2	0,2	11,8	48,2	11,0	12,0	166,7	14,1	27,0	14,8	100,5
<i>Benzo(a)antraceno</i>	74,8	693	0,5	20,4	0,4	0,2	0,1	7,3	0,2	0,2	18,8	50,0	0,0	15,4	25,4	21,4	42,0	22,6	57,6
Criseno	108	846	0,6	41,1	0,9	0,2	0,2	9,5	0,1	0,2	11,1	29,5	0,0	9,7	15,8	12,5	23,0	13,9	21,7
<i>Benzo(a)pireno</i>	88,8	763		29,5	1,4	-	-	5,1	0,6	-	-	44,6	-	21,7	-	0,1	-	-	30,4
<i>Dibenzo(ah)antraceno</i>	6,22	135	3,6	20,9	4,9	0,9	0,5	6,5	-	-	-	53,6	-	-	-	-	128,0		22,8
Σ Potência Mutagênica			-	125	-	-	373	1792	58	-	120	83	-	-	23	81	1114	-	433

ISQG ou TEL - concentração abaixo da qual é raramente esperado efeito. PEL - concentração acima da qual é frequentemente esperado efeito deletério sobre a biota. Negrito: valores entre ISQG e PEL; Itálico: HPAs potencialmente cancerígenos (Grupo 1: Carcinogênicos aos humanos; Grupo 2A: Provavelmente carcinogênicos aos humanos; Grupo 2B: Possivelmente carcinogênico aos humanos); Sublinhado: valor acima de PEL;. Potência Mutagênica: somatório dos valores das respostas em ensaios -S9mix e +S9mix expressos em rev/g equivalente de sedimento seco.

4. Conclusões

A atividade citotóxica e mutagênica das amostras de sedimentos provou ser um instrumento importante para determinar a degradação da qualidade ambiental. A presença de contaminantes no local Ta010, mesmo após a intervenção, mostraram o comprometimento do rio a partir desta fonte. Estudos revelam que para uma melhor eficiência na retirada de poluentes, como HPAs, tecnologias integradas (químicas, biológicas e físicas) devem ser utilizadas para combinar a separação e destruição de HPAs, evitando que os produtos sejam deslocados de um local para outro (Gan et al., 2009). Evidências deste deslocamento foram observadas no presente estudo do TA010 para jusante (TA006 e TA004). Para isso, pesquisas têm sido realizadas na busca de técnica mais adequadas que concentrem uma melhor eficiência e economia, não só para HPAs como também para outros contaminantes.

As respostas mutagênicas encontradas nos extratos orgânicos de sedimento dos locais Ta006 e Ta032 geraram um alerta com a qualidade ambiental dessa região, que além estar comprometendo a vida dos organismos aquáticos, podem estar expondo à população humana, uma vez que estes pontos de amostragens possuem captação de água para abastecimento público. Assim, é recomendável que haja critérios mais seguros na escolha do local para este uso, devendo apresentar pouca interferência de atividades humanas para garantir uma melhor qualidade da água a seus usuários.

A composição química do meio aquático é muito complexa, permitindo múltiplas interações entre componentes bióticos e abióticos, gerando efeitos sinérgicos, antagônicos e tóxicos (Horn et al., 2004). Os valores-guia para HPAs permitiram identificar um decréscimo de qualidade no sedimento nas áreas de maior influência do sítio contaminado. Associação das informações de análises químicas e biológicas elevam a eficiência do diagnóstico. Os dados do ensaio *Salmonella*/microsoma em nível molecular serviram como biomarcadores,

favorecendo a determinação do impacto causado no sedimento do rio Taquari, a partir do sítio de solo contaminado. Esta propriedade do ensaio e seu uso em áreas sob ameaça ambiental permite o diagnóstico da presença de baixas concentrações de poluentes mutagênicos/ou citotóxicos, servindo como um alerta de contaminação ambiental e prevenção de danos ao patrimônio genético da fauna e da flora afetadas pelas atividades humanas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado cedida a Paula Hauber Gameiro e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela bolsa de iniciação científica da Naiara Costa Pereira. Agradecimentos também ao grupo de amostragem da FEPAM, pelas coletas realizadas; ao Alexandre Brandelli e Jaqueline Delazari do Laboratório Bioensaios, por parte das análises de HPAs. Esta pesquisa foi financiada Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processos CNPq 307884/2011-2 e CNPq 479566/2012-7).

5. Referências bibliográficas

- APPEL, J.S.L.; TERESCOVA, V.; RODRIGUES, V.C.B.; VARGA, V.M.F. Aspectos toxicológicos do preservativo de madeira CCA (arseniato de cobre cromato): revisão. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 19, p. 29 – 43, 2007.
- APHA. Standart Methods For The Examination Of Water And Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation. 18th eds. M.A.H Franson, Washington, p. 1-20, 1992.

- ATSDR (Agência para o Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças). 2008. Resúmen de Salud Pública—Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Disponível em: [/http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.pdf). Acesso em: 21 jan 2015.
- 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.*, v. 97, p. 267–287, 1982.
- BOLDRINI, C.; EYSINK, G.G.J.; MARTINS, M.C.; LAMPARELLI, M.C. Contaminantes na bacia do rio Cubatão e seus reflexos na biota aquática. São Paulo: CETESB, Relatório Técnico, p. 81, 1990.
- BRASIL, 2004. Conselho Nacional do Meio Ambiente - Resolução CONAMA nº 344, de 25 de março de 2004. Dispõe sobre diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/conama>. Acesso em: 03 dez. 2014.
- Brasil, 2009. Portaria CONAMA no 420 de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto a presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. CONAMA, Brasília, Brazil, 2009.
- CCME Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. Canadian Environmental Quality Guidelines - Summary Tables. 2002.
- CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo). 2006. Critérios para avaliação da qualidade de sedimento – Anexo VI. Série Relatórios. São Paulo: CETESB, 4p.

- CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo). 2013. Relação de áreas contaminadas e reabilitadas do Estado de São Paulo. Dezembro de 2013. Disponível em: [/http://www.cetesb.sp.gov.br](http://www.cetesb.sp.gov.br). Acesso em: 4 jan.2015.
- CHEN, G. & WHITE, P.A. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutat Res.*, v. 567, p. 151-225, 2004.
- CLAXTON, L.D.; HOUK, V.S.; HUNGHERS, T. J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat.Res.*, v. 410, p. 237–243, 1998.
- CLAXTON, L.D.; UMBUZEIRO, G.A.; DEMARINI, D.M.The Salmonella mutagenicity assay: the stethoscope of genetic toxicology for the 21st century. *Environ. Health Persp.*,v. 118, n. 11, p. 1515-1522, 2010.
- CORONAS, M.V.; BAVARESCO, J.,; ROCHA, J.A.V.; GELLE, A.M.; CARAMÃO, E.B.; RODRIGUES, M.L.K.; VARGAS, V.M.F.Attic dust assessment near a wood treatment plant: Past air pollution and potential exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 95, p. 153–160, 2013.
- COSTA, T.C.; BRITO, K.C.T.; ROCHA, J.A.V.; LEAL, K. A. RODRIGUES, M.L.K.; MINELLA, J.P.G.; MATSUMOTO, S.T.; VARGAS, V.M.F. Run off of genotoxic compounds in river basin sediment under the influence of contaminated soils. *Ecotox. Environ.*, v. 75, p. 63–72, 2012.
- COURTY, B.; CURIEUX, F.L.; BELKESSAMC, L.; LABOUDIGUEC, A.; MARZINA, D. Mutagenic potency in *Salmonella typhimurium* of organic extracts of soil samples originating from urban, suburban, agricultural, forest and natural areas. *Mutat Res.*, v. 653, p. 1–5, 2008

- DOLÉDEC, S. & STATZNER, B. Invertebrate traits for the biomonitoring of large European rivers: an assessment of specific types of human impact. *Freshw. Biol.*, v. 53, p. 617–634, 2008.
- GAN, S.; LAU, E.V.; NG, H.K. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*, v. 172, p. 532–549, 2009.
- GICHNER, T.; WAGNER, E.D.; PLEWA, M.J. Pentachlorophenol-mediated mutagenic synergy with aromatic amines in *Salmonella typhimurium*. *Mutat.Res.*, v. 420, p. 115–124, 1998.
- GOMES, A.S.; PALMA, J.J.C.; SILVA, C.G. Causas e conseqüências do impacto ambiental da exploração dos recursos minerais marinhos. *Brazilian Journal of Geophysics*, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2000.
- GOMES, H.I.; DIAS-FERREIRA, C.; OTTOSEN, L.M.; RIBEIRO, A.B. Electrodialytic remediation of polychlorinated biphenyls contaminated soil with iron nanoparticles and two different surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.433, p. 189–195, 2014.
- HARITASH, A.K. & KAUSHIK, C.P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, v. 169, p. 1–15, 2009.
- HORN, R.C.; ROCHA, J.A.V.; VARGAS, V.M.F. Determination of sediment mutagenicity and cytotoxicity in an area subjected to petrochemical contamination. *Mutagenesis*, v. 19, n. 6, p. 445–451, 2004.
- HOUK, V. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. *A review. Mutat.*, v. 277, p. 91-138, 1992.

- IARC (Internacional Agency for Reserch on Câncer). 2010. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 2010. Some non-heterocyclic aromatic hidrocarbons and some related exposure. *IARC*, Lyon, 92, p.33-110.
- ISLAM, M. N.; JO, Y.; PARK, J. Remediation of PAHs contaminated soil by extraction using subcritical water. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v.18, p.1689–1693, 2012.
- JIA, Y.T. & CHEN, Y.F. River health assessment in a large river: Bioindicators of fish population. *Ecological Indicators*, v. 26. p. 24–32, 2013.
- KADO, N.; GUIRGUIS, G.; FLESSEL, C.; CHAN, R.; CHANG, K.; WESOLOWSI, J. Mutagenicity of fine (less than 2.5 microns) airborne particles: diurnal variation in community air determined by a Salmonella micro preincubation (microsuspension) procedure. *Environ. Mutagen.*, v. 8, p. 53-66, 1986.
- LIEDEKERKE, M.V.; PROKOP, G.; RABL-BERGER, S.; KIBBLEWHITE, M.; LOUWAGIE, G. Joint Research Centre. Progress in the management of Contaminated Sites in Europe. *JRC Reference Reports*, EUR 26376 EN, European Commission, 2014.
- MAERTENS, R.M.; GAGNÉ, R.W.; DOUGLAS, G.R.; ZHU, J.; WHITE, P.A. Mutagenic and carcinogenic hazards of settled house dust II: *Salmonella* mutagenicity. *Environ. Sci. Technol.*, v. 42, p. 1754–1760, 2008.
- MARON, D.M. & AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, v. 11, p. 173-215, 1983.
- MOZETO, A.A. 2004. Sedimentos e Particulados Lacustres: Amostragens e Análises Biogeoquímicas. In: Bicudo C.E.M. & Bicudo, D. C. (Org.). Amostragem em Limnologia. São Carlos: RiMa. p. 295 –320.

- OHE, T.; WATANABE, T; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface Waters: a review. *Mutat.Res.*, v. 567, p. 109-149, 2004.
- PAGANO, A. D. & ZEIGER, E. Conditions for detecting the mutagenicity of divalent metals in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mol. Mutag.*, v. 19, p. 139-146, 1992.
- POHREN, R.S.; ROCHA, J.A.V.; LEAL, K.A.; VARGAS, V.M.F. Soil mutagenicity as a strategy to evaluate environmental and health risks in a contaminated area. *Environ. Int.*, v. 44, p.40–52, 2012.
- TAGLIARI, K.C.; CECCHINI, R.; ROCHA, J.A.V.; VARGAS, V.M.F. Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. *Mutat.Res.* v. 561, p. 101–117, 2004.
- TERRA, N.R.; FREIDEN, I.R.; FACHEL, J.M.G. Ecotoxicologia do sedimento do Rio Taquari (Rio Grande do Sul, Brasil) utilizando *Daphnia magna*, 1820, Straus como organismo-teste. *Acta Limnol. Bras.*, v. 20, n. 2, p. 153-159, 2008.
- USEPA (Agência Internacional de Proteção Ambiental dos Estados). 2008. Method 3550C. Disponível em: [/http://www.epa.gov](http://www.epa.gov). Acesso em: 7 Jan. 2015.
- VARGAS, V.M.F.; MOTTA, V.E.P.; HENRIQUES, J.A.P. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat.Res.*, v. 319, p. 31-45, 1993.
- VARGAS ,V.M.F., GUIDOBONO, R.R., JORDÃO, C., HENRIQUES, J.A.P. Use of two short term test to evaluate genotoxicity of river water treated with different concentration extraction procedure. *Mutat Res.*, v. 343, p. 31–52, 1995.
- VARGAS, V.M.F., MIGLIAVACCA, S.B., MELO, A.C., HORN, R.C., GUIDOBONO, R.R., FERREIRA, I.C.F.S, et al. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutat Res.* v. 490, p. 141–158, 2001.

- VARGAS, V.M.F.; MIGLIAVACCA, S.B.; HORN, R.C & TERRA, N.R. Comparative temporal ecotoxicological study in a river basin influenced by petrochemical industries. *Science of the Total Environment*, v. 392, p. 79-92, 2008.
- WATANABE, T.; HASEI, T.; TAKAHASHI, T.; ASANOMA, M.; MURAHASHI, T.; HIRAYAMA, T. et al. Detection of a novel mutagen, 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, as a major contaminant in surface soil in Osaka and Aichi Prefectures, Japan. *Chem Res Toxicol.*, v. 18, p. 283–289, 2005.
- WATANABE, T.; TAKAHASHI, K.; KONISHI, E.; HOSHINO, Y.; HANSEI, T.; ASANOMA, M. et al. Mutagenicity of surface oil from residential areas in Kyoto city, and identification of major mutagens. *Mutat Res.*, v. 649, p. 201–212, 2008.
- WHITE P.A. & CLAXTON L.D. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutat Res.*, v. 567, p. 227-345, 2004.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação foi embasada, em estudos anteriores, na região que identificaram rotas de contaminantes para o rio Taquari, através de sítio com solo contaminado por preservantes de madeira, com passivo ambiental identificado. Em processos de monitoramento da área, realizados pela FEPAM, foram identificadas fontes de contaminação ainda ativas presentes no solo. Tendo em vista a importância deste rio para o Estado, através de atividades agrícolas, pecuária, estabelecimentos residenciais e comerciais a possibilidade de risco ao ecossistema e a saúde humana é expressiva. Diante disso, processo Institucional de licenciamento para remediação desse sítio foi realizado para a retirada das principais fontes ativas.

O presente estudo foi desenvolvido com a finalidade de verificar a qualidade deste rio nas diferentes fases de intervenção da área. Para este propósito foram utilizados o bioensaio *Salmonella*/microssoma para avaliar mutagenicidade e análises de HPAs nos extratos orgânicos de sedimentos. Essa análise conjunta é uma ferramenta útil, pois o ensaio biológico selecionado não se limita a definição dos efeitos, mas também pode identificar classes dos compostos presentes em amostras e contribuir com efeito observado.

A atividade citotóxica e mutagênica das amostras de sedimentos provou ser um instrumento importante para determinar a degradação da qualidade ambiental. A presença de contaminantes no local Ta010, mesmo após a intervenção, mostrou o comprometimento do rio a partir desta fonte. Estudos revelam que para uma melhor eficiência na retirada de poluentes, como HPAs, tecnologias integradas (químicas, biológicas e físicas) devem ser utilizadas para combinar a separação e destruição de HPAs, evitando que os produtos sejam deslocados de um local para outro (Gan et al., 2009). Evidências deste deslocamento foram observadas no presente estudo do Ta010 para áreas a jusante (TA006 e TA004). Com esta

meta, pesquisas têm sido realizadas na busca de técnica mais adequadas que concentrem uma melhor eficiência e economia, não só para HPAs como também para outros contaminantes.

As respostas mutagênicas encontradas nos extratos orgânicos de sedimento dos locais Ta006 e Ta032 geraram um alerta com a qualidade ambiental dessas regiões, que além de estar comprometendo a vida dos organismos aquáticos, podem estar expondo a população humana, uma vez que estes pontos de amostragens possuem captação de água para abastecimento público. Assim, é recomendável que haja critérios mais seguros na escolha do local para este uso, devendo apresentar pouca interferência de atividades humanas para garantir uma melhor qualidade da água a seus usuários.

A composição química do meio aquático é muito complexa, permitindo múltiplas interações entre componentes bióticos e abióticos, gerando efeitos sinérgicos, antagônicos e tóxicos (Horn et al., 2004). Os dados do ensaio *Salmonella*/microsoma em nível molecular serviu como um biomarcador, ajudando a determinar o impacto causado no sedimento do rio Taquari, a partir do sítio de solo contaminado. Esta propriedade do ensaio e seu uso em áreas sob ameaça ambiental permite o diagnóstico da presença de baixas concentrações de poluentes mutagênicos/ou citotóxicos, servindo como um alerta de contaminação ambiental e prevenção de danos ao patrimônio genético da fauna e da flora afetadas pelas atividades humanas.

Na comparação dos resultados com os valores-guia ISQG e PEL para HPAs, estes dados sugerem atenção por parte dos órgãos ambientais, pois foi possível identificar um decréscimo de qualidade no sedimento nas áreas de maior influência do sítio contaminado, necessitando de intervenções mais severas para a retirada desses contaminantes. Associação das informações de análises químicas e biológicas elevou a eficiência do diagnóstico.

Este trabalho foi realizado com a parceria do Programa de Pós Graduação em Ecologia da UFRGS e da Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler – FEPAM, órgão de proteção ambiental do Estado do Rio Grande do Sul.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIAN, L. & GORISCH, H. Microbial transformation of chlorinated benzenes under anaerobic conditions. *Res. Microbio.*, v. 153, p. 131 e 137, 2002.
- AMES, B.N. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: Chemical mutagens, principles methods for their detection. New York: A. Hollaender, v. 1, p. 267-282, 1971.
- APPEL, J.S.L.; TERESCOVA, V.; RODRIGUES, V.C.B.; VARGA, V.M.F. Aspectos toxicológicos do preservativo de madeira CCA (arseniato de cobre cromato): revisão. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 19, p. 29 – 43, 2007.
- BARTENFELDER, D. Stabilization: a strategy for RCRA corrective action. In: RCRA CORRECTIVE ACTION STABILIZATION TECHNOLOGIES. *Proceedings*, Washington: USEPA, p. 1-9, 1992.
- BEHZAD, H.M.; ASHORI, A.; TARMIAN, A.; TAJVIDI, M. Impacts of wood preservative treatments on some physico-mechanical properties of wood flour/high density polyethylene composites. *Construction and Building Materials*, v. 35, p. 246–250, 2012.
- BODEK, I., LYMAN, W.J.; REEHL, W.F.; ROSENBLATT, D. H, (eds). Arsenic, Chapter 7.2, Environmental Inorganic Chemistry Properties, Processes, and Estimation Methods (SETAC special publications service). Pergamon Press, New York, p.1-10, 1988.

- BOLDRINI, C.; EYSINK, G.G.J.; MARTINS, M.C.; LAMPARELLI, M.C. Contaminantes na bacia do rio Cubatão e seus reflexos na biota aquática. São Paulo: CETESB, Relatório Técnico, p. 81, 1990.
- BONE, J.; HEAD, M.; BARRACLOUGH, D.; ARCHER, M.; SCHEIB, C.; FLIGHT, D.; VOULVOULIS, N. Soil quality assessment under emerging regulatory requirements. *Environ Int.*, v. 36, p. 609-22, 2010.
- BORBA, R. P. Arsênio em ambiente superficial: processos geoquímicos naturais e antropogênicos em uma área de mineração aurífera. 115 f. Campinas. Tese (Doutorado) – Instituto de Geociências, Universidade de Campinas, 2002.
- BOTTINELLI, N.; JOUQUET, P.; CAPOWIEZ, Y.; PODWOJEWSKI, P.; GRIMALDI, M.; PENG, X. Why is the influence of soil macrofauna on soil structure only considered by soil ecologists *Soil & Tillage Research*, v. 146, p. 118–124, 2015.
- BOZLAKER, A.; MUEZZINOGLU, A.; ODABASI, M. Atmospheric concentrations, dry deposition and air–soil exchange of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an industrial region in Turkey. *J. Hazard. Mater.* v. 153, p. 1093-1102, 2008.
- BRASIL, 1985. Ministério da Agricultura. Portaria n° 329/1985. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 13 dez. 2014.
- BRASIL, 1998. Ministério da Agricultura. Decreto-Lei n° 264/1998. Disponível em: <http://www.primemineconomia.pt/PresentationLayer/ResourcesUser/docs/d22534.pdf>. Acesso em: 13 dez. 14
- BRASIL, 2004. Conselho Nacional do Meio Ambiente - Resolução CONAMA n° 344, de 25 de março de 2004. Dispõe sobre diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras, e dá outras

- providências. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama>>. Acesso em: 03 dez. 2014.
- BRASIL, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA n° 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama>>. Acesso em: 01 dez. 2014.
- BRASIL, 2009. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA n° 420. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, n° 249, 30/12/2009, p. 81-84.
- BROWN, A.W.A. WILEY, J. AND SONS, New York. Ecology of Pesticides, 1978, 525 p.
- CAVDAR, A.D. Effect of various wood preservatives on limiting oxygen index levels of fir wood. *Measurement*, v. 50, p. 279–284, 2014.
- CCME Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. Canadian Environmental Quality Guidelines - Summary Tables. 2002.
- CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo). 1999. Manual de gerenciamento de áreas contaminadas. São Paulo.
- CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo). 2004. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado De São Paulo 2003 – São Paulo.
- CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo). 2006. Critérios para avaliação da qualidade de sedimento – Anexo VI. Série Relatórios. São Paulo: CETESB, 4p.
- CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo). 2011. Qualidade do solo. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/informações-básicas/5-poluição>. Acesso em 10 dez 2014.

- CHEN, G. & WHITE, P.A. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutat Res.* v. 567, p. 151-225, 2004.
- CHOUDHURY, H.; COLEMAN, J.; DE ROSA, C.T.; STARA, J.F. Pentachlorophenol: health and environmental effects profile. *Toxicol. Ind. Health*, v. 2, p. 483-571, 1986.
- CLAXTON, L.D.; HOUK, V.S.; HUNGHERS, T. J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res.*, v. 410, p. 237-243, 1998.
- CLAXTON, L.D.; MATTHEWS, P.; WARREN, S.H. The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: *Salmonella* mutagenicity. The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: *Salmonella* mutagenicity. *Mutat. Res.*, v. 567, p. 347-399, 2004.
- CLAXTON, L.D.; UMBUZEIRO, G.A.; DEMARINI, D.M. The *Salmonella* mutagenicity assay: the stethoscope of genetic toxicology for the 21st century. *Environ. Health Persp.*, v. 118, n. 11, p. 1515-1522, 2010.
- COCKCROFT R. Timbers preservatives and methods of treatment. *Timberlab Papers Princes Risborough Laboratory*, v. 46, p. 1-6, 1971.
- CORONAS, M.V.; BAVARESCO, J., ROCHA, J.A.V.; GELLE, A.M.; CARAMÃO, E.B.; RODRIGUES, M.L.K.; VARGAS, V.M.F. Attic dust assessment near a wood treatment plant: Past air pollution and potential exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 95, p. 153-160, 2013.
- COSTA, T.C.; BRITO, K.C.T.; ROCHA, J.A.V.; LEAL, K. A. RODRIGUES, M.L.K.; MINELLA, J.P.G.; MATSUMOTO, S.T.; VARGAS, V.M.F. Run off of genotoxic compounds in river basin sediment under the influence of contaminated soils. *Ecotox. Environ.*, v. 75, p. 63-72, 2012.

- CROZERA, E. H. Identificação das áreas contaminadas no município de Ribeirão Pires – São Paulo. 189 f. São Paulo, Tese (Doutorado) – Instituto de Geociência –Universidade de São Paulo. 2001
- DA SILVA JÚNIOR, F.M.R. & VARGAS, V.M.F. Using the *Salmonella* assay to delineate the dispersion routes of mutagenic compounds from coal wastes in contaminated soil. *Mutation Research*, v. 673, p.116 – 123, 2009.
- DAVIS, A.; CAMPBELL, J.; GILBERT, C.; RUBY, M; BENNETT, M.; TOBIN, S. Attenuation and biodegradation of chlorophenols in ground water at a former wood treating facility. *Ground Water*, v. 32, n. 2, p. 248–257, 1996.
- DEXTER, A.R. Advances in characterization of soil structure. *Soil Till. Res.*, v.11, p.199–238, 1988.
- EISLER, R., 1989. Pentachlorophenol Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: a Synoptic Review. U.S. Fish and Wildlife Service. Disponível em: < www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?AD=ADA322630>. Acesso em: 13/12/14.
- ENVIRONMENT CANADA, 1971.Pulp and paper effluent regulation. Ottawa: Environmental Canada, 7p.
- FRANCE, 1983. Arrêtédu 28 octobre 1975 pris em execution dès articles3,5,6,10, et 15 du décret n° 75-996 du 28 octobre 1975 portant application dès dispositions de l’article 14-1 de la loidu 16 décembre 1964 modifié e relativeau régime e à laré partition dès eaux et à la lute contreleur pollution. *Pollution des eaux: redevences. Journal Officiel de la Republique Française*, 5. e.d. Paris, 22 septembre, p. 21-107.
- GAN, S.; LAU, E.V.; NG, H.K. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*, v. 172, p. 532–549, 2009.

- GAO, Y.C.; GUO, S.H.; WANG, J.N.; LI, D.; WANG,H.; ZENG, D.H. Effects of different remediation treatments on crude oil contaminated saline soil. *Chemosphere*, v. 117, p. 486–493, 2014.
- HINGSTON, J.A.; COLLINS, C.D.; MURPHY, R.J.; LESTER, J. N. Leaching of chromate copper arsenate wood preservatives: a review. *Environmental Pollution*, v. 111, p. 53 – 66, 2001.
- HOLT. M.S. Sources of chemical contaminants and routes into the fresh water environment. *Food Chem Toxicol*, v. 38, p. 21-27, 2000.
- HORN, R.C.; ROCHA, J.A.V.; VARGAS, V.M.F. Determination of sediment mutagenicity and cytotoxicity in an area subjected to petrochemical contamination. *Mutagenesis*, v. 19, n. 6, p. 445–451, 2004.
- HOUK, V. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review. *Mutat.*, v. 277, p. 91-138, 1992.
- HUDCOVÁ, H. ; BADUROVÁ, J.; ROZKOSNÝ, M.; SOVA, J; FUNKOVÁ, R.; SVOBODOVÁ, J. Quality and mutagenicity of water and sediment of the streams impacted by the former uranium mine area OlšieDrahonín (Czech Republic). *Journal of Environmental Radioactivity*, v. 116, p. 159-165, 2013.
- IARC (Internacional Agency for Reserch on Câncer). 1991. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: occupational exposures in insecticide application, and some pesticides. Pentachlorophenol. Lyon, v. 53, p. 371–402.
- IARC (Internacional Agency for Reserch on Câncer). 2010. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 2010. Some non-heterocyclic aromatic hidrocarbons and some related exposure. IARC, Lyon, v. 92, p. 33.

- JHA, A.N. Genotoxicological studies in aquatic organism: an overview. *Mutat.Res.*, v. 552, p. 1-17, 2004.
- KADO, N.; GUIRGUIS, G.; FLESSEL, C.; CHAN, R.; CHANG, K.; WESOLOWSI, J. Mutagenicity of fine (less than 2.5 microns) airborne particles: diurnal variation in community air determined by a Salmonella micro preincubation (microsuspension) procedure. *Environ. Mutagen.*, v. 8, p. 53-66, 1986.
- KAY, B.D. Rates of change of soil structure under different cropping systems. *Adv.Soil Sci.*, v.12, p. 1–52, 1990.
- KIM, Y.S.; MIN, J.; HONG, H.N.; PARK, J.H.; PARK, K.S.; GU, M.B. Gene expression analysis and classification of mode of toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs) *Escherichia coli*. *Chemosphere*, v. 66, p. 1243–1248, 2007.
- LAH, B.; VIDIC, T.; GLASENCNICK, E.; CEPELJNIK, T.; GORJANC, G.;MARINSEK–LOGAR, R. Genotoxicity evaluation of water soil leach ates by Ames test, comet assay, and preliminary *Tradescantia* micronucleus assay. *Environmental Monitoring Assessment*, v.139, p. 107 – 118, 2008.
- LEMONS, A.T.; ROSA, D.P.; ROCHA, J.A.V.; VARGAS, V.M.F. Mutagenicity assessment in a river basin influenced by agricultural, urban and industrial sources. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, p. 2058–2065, 2009.
- LEPAGE ES. Preservativos e sistemas preservativos. In: Lepage, ES (Coord.) *Manual de Preservação de Madeiras*. São Paulo: IPT; SICCT. v.1, n.6, p.279-330, 1986.
- LIAO, X.; ZHAO, D.; YAN, X.; HULING, S.G. Identification of per sulfate oxidation products of polycyclic aromatic hydrocarbon during remediation of contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, v. 276, p. 26–34, 2014.

- LIEDEKERKE, M.V.; PROKOP, G.; RABL-BERGER, S.; KIBBLEWHITE, M.; LOUWAGIE, G. Joint Research Centre. Progress in the management of Contaminated Sites in Europe. *JRC Reference Reports*, EUR 26376 EN, European Commission, 2014.
- LLADÓ, S.; COVINO, S.; SOLANAS, A.M.; VIÑAS, M.; PETRUCCIOLI, M.; D'ANNIBALE, A. Comparative assessment of bioremediation approaches to highly recalcitrant PAH degradation in a real industrial polluted soil. *Journal of Hazardous Materials*, v.248–249, p.407–414, 2013.
- MARKER, A. Avaliação ambiental de terrenos com potencial de contaminação: gerenciamento de riscos em empreendimentos imobiliários. *Caixa*, Brasília, p. 164, 2008.
- MARKER, A.; CUNHA, R.C.A.; GUNTHER, M.A. Avaliação das águas contaminadas na RMSP. *Saneamento Ambiental*, São Paulo, v. 25, p. 36-9, 1994.
- MARON, D.M. & AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, v. 11, p. 173-215, 1983.
- MASSOD, F. & MALIK, A. Cytotoxic and genotoxic potential of tannery waste contaminated soils. *Science of the Total Environment*, v. 444, p. 153-160, 2013.
- MERCER, T.G. & FROSTICK, L.E. Evaluating the potential for environmental pollution from chromate copper arsenate (CCA)-treated wood waste: A new mass balance approach. *Journal of Hazardous Materials*, v. 276, p. 10–18, 2014.
- MILLS, T.; ARNOLD, B.; SIVAKUMARAN, S. NORTHCOTT, G. VOGELER, I.; ROBINSON, B.; NORLING, C.; LEONIL, D. Phytoremediation and long-term site management of soil contaminated with pentachlorophenol (PCP) and heavy metals. *Journal of Environmental Management*, v. 79, p. 232–241, 2006.
- MONARCA, S.; FERETTI, D.; ZERBINI, I.; ALBERTI, A.; ZANI, C.; RESOLA, S.; GELATTI, U.; NARDI, G. Soil contamination detected using bacterial and plant

- mutagenicity tests and chemical analyses. *Environmental Research Section A*, v. 88, p.64-69, 2002.
- MORTELMANS, K. & ZEIGER, E.; 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.*, v. 455, pp. 29-60.
- MOZETO, A.A. 2004. Sedimentos e Particulados Lacustres: Amostragens e Análises Biogeoquímicas. In: Bicudo C.E.M. & Bicudo, D. C. (Org.). Amostragem em Limnologia. São Carlos: RiMa, p. 295 –320.
- MOZETO, A.A.; UMBUZEIRO, G.A.; JARDIM, W.F. Métodos de coleta, análises físico-químicas e ensaios biológicos e ecotoxicológicos de sedimentos de água doce. São Carlos, 2006.
- OHE, T.; WATANABE, T; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface Waters: a review. *Mutat. Res.*, v. 567, p. 109-149, 2004.
- PEREIRA, T.S.; ROCHA, J.A.V.; DUCCATTI, A.; SILVERIA, G.A.; PASTORIZA, T.F.; BRINGUENTI, L.; VARGAS, V.M.F. Evaluation of mutagenic activity in supply water at three sites in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mutat. Res.*, v. 629, p. 71-80, 2007.
- PERELO, L.W. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *Journal of Hazardous Materials*, v. 177, p. 81–89, 2010.
- PEROVIĆ, S.; PEROVIĆ, A.; ERDINGER, L.; HOLLERT, H. Assessment of The Mutagenic Potential of Skadar Lake Sediments Using the *Salmonella* Microsomal Assay. *Arch. Biol. Sci.*, v .65, n. 3, p. 1189-1194, 2013.
- POHREN, R.S.; ROCHA, J.A.V.; LEAL, K.A.; VARGAS, V.M.F. Soil mutagenicity as a strategy to evaluate environmental and health risks in a contaminated area. *Environ. Int.*, v. 44, p.40–52, 2012.

- POLLACK, N.; CUNNINGHAM, A.R.; ROSENKRANZ, H.S. Environmental persistence of chemicals and their carcinogenic risks to humans. *Mutat.Res.*, v. 528, p. 81-91, 2003.
- POMPEIA, S. L. Procedimentos técnicos para recuperação de áreas degradadas por poluição. Simpósio sul americano, simpósio de áreas degradadas. *Anais*, Curitiba, Foz do Iguaçu, FUPEP, v. 1, p. 63 - 74, 1994.
- RICHARDSON, S.D.; PLEWA, M.J.; WAGNER, E.D.; SCHOENY, R.; DEMARINI, D.M. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by products in drinking water: a review and roadmap for research. *Mutat.Res.*, v. 636, p. 178–242, 2007.
- RIGAUD S.; DI GIORGIO, C.; RADAKOVITCH, O.; GARNIER, J.M.; DE MÉO, M. Genotoxicity of sediment extracts of the Berre lagoon (France). *Chemosphere*, v. 88, p. 937–944, 2012.
- RIO GRANDE DO SUL, 2006. Conselho Estadual do Meio Ambiente. Resolução CONSEMA nº 129/2006. Disponível em: <<http://www.sema.rs.gov.br>>. Acesso em: 03 dez. 2014.
- RIVAS, F.J.; BELTRÁN, F.J.; ACEDO, B. Chemical and photochemical degradation of acenaphthylene. *J. Hazard. Mater.*, v. 75, p.89–98, 2000.
- RODRIGUES, S.M.; PEREIRA, M.E.; SILVA, E.F.; HURSTHOUSE, A.S.; DUARTE, A.C. A review of regulatory decisions for environmental protection: Part II—The case-study of contaminated land management in Portugal. *Environ Int.*, v. 35, p. 214–225, 2009.
- ROGERS, S.W.; ONG, S.K.; MOORMAN, T.B. Mineralization of PAHs in coal-tar impacted aquifer sediments and associated microbial community structure investigated with FISH. *Chemosphere*, v. 69, p. 1563–1573, 2007.

- SANDERS, J. G.; REIDEL, G.F.; 1987. Control of trace element toxicity by phytoplankton. In: Saunders, J.A., Kosak-Channing, L., Conn, E.E. (Eds.), *Phytochemical Effects of Environmental Compounds*. Plenum Press, New York, pp. 131-149.
- SEDMAN, R.M. The development of applied action levels for soil contact: as cenario for the exposure of humans to soil in a residential setting, *Environ. Health Perspect*, v. 79, p. 291-313, 1989.
- SINGH, K.P.; MALIK, A., SINGH, V.K.; SINHA, S. Multi-way data analysis of soils irrigated with wastewater — a case study. *Chemom Intell Lab.*, v.83, p.1-12, 2006.
- SHENG, Z.G.; LI, Y.; FRAN, R.M.; CHAO, X.J.; ZHU, B. Z. .Lethal synergism between organic and inorganic wood preservatives via formation of an unusual lipophilic ternary complex. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 266, p 335–344, 2013.
- SOLDÁN, P. & BANDUROVÁ, J. A method for screening for the risk of chronic effects of surface water pollution. *Environ. Monit*, v.185, p. 21–30, 2013.
- TAGLIARI, K.C.; CECCHINI, R.; ROCHA, J.A.V.; VARGAS, V.M.F. Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. *Mutat. Res.*, v. 561, p. 101–117, 2004.
- TAYLOR, R. & SMITH, I.; The state of New Zealand’s environment, New Zealand Ministry for the Environment. *Wellington*, New Zealand, 1997.
- TERRA, N.R.; FREIDEN, I.R.; FACHEL, J.M.G. Ecotoxicologia do sedimento do Rio Taquari (Rio Grande do Sul, Brasil) utilizando *Daphnia magna*, 1820, Straus como organismo-teste. *Acta Limnol. Bras.*, v. 20, n. 2, p. 153-159, 2008.
- TERRA, P. & LADISLAU, W. Césio 137. *Ecologia e desenvolvimento*, Rio de Janeiro, p. 36–41, 1991.

- USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). 1991. Technical support document for water quality-based toxic control, EPA/505/2-90-001, Environmental Protection Agency Washington, D.C.
- USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). 2004. Cleaning up the nation's waste sites: markets and technology trends. Technology Innovation and Field Services Division, Office of Solid Waste and Emergency Response, EPA 542-R-04-015.U.S., Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- VARGAS, V.M.F.; MOTTA, V.E.P.; HENRIQUES, J.A.P. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat.Res.*, v. 319, p. 31-45, 1993.
- VARGAS, V.M.F.; MIGLIAVACCA, S.B.; HORN, R.C & TERRA, N.R. Comparative temporal ecotoxicological study in a river basin influenced by petrochemical industries. *Science of the Total Environment*, v. 392, p. 79-92, 2008.
- VIDOR FLR. *Avaliação de processo de inspeção e retratamento de postes de madeira*. 124 f. Dissertação (Engenharia e Tecnologia de Materiais) – Faculdade de Engenharia, Física e Química, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2003.
- WALLEY, S.; COBHAM, P.; VINDEN, P. 1996a. Leaching of Copper, Chrome, Arsenic Treated Timber: Simulated Rainfall Testing (IRG/WP 96-50074). The International Research Group on Wood Preservation, Stockholm.
- WALLEY, S.; COBHAM, P. VINDEN, P. 1996b. Preservative Leaching from Copper, Chrome, Arsenate Treated Timber: Towards an International Standard for Environmental Monitoring (IRG/WP 96-50076). The International Research Group on Wood Preservation, Stockholm.

- WARREN, S.H.; CLAXTON, L.D.; DILIBERTO, J. HUGHES, T.J.; SWANK, A.; KUSNIERZ, D.H.; MARSHALL, V.; DEMARINI, D.M. Survey of the mutagenicity of surface water, sediments, and drinking water from the Penobscot Indian Nation. *Chemosphere*, v. 120, n. 2015, p. 690–696.
- WEIS, J. S.; WEIS, P. Effects of chromated copper arsenate (CCA) pressure treated wood in the aquatic environment. *Ambio*, v. 24, p. 269-274, 1995.
- WEIS, P.; WEIS, J. S.; GREENBERG, A.; NOSKER, T.J. Toxicity of construction materials in the marine environment: a comparison of chromated-copper-arsenate-treated wood and recycled plastic. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* v. 22, p. 99-106, 1992.
- WHITE P.A. & CLAXTON L.D. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutat Res.*, v. 567, p. 227- 345, 2004.
- WILSON, S.C. & JONES, K.C. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Environ. Polluti.*, v. 81, p. 229–249, 1993.
- YU, HY.; LI, F.B.; YU, W.M.; LI, Y.T.; YANG, G.Y.; ZHOU, S.G.; ZHANG, T.B.; GAO, Y.X.; WAN, H.F. Assessment of organochlorine pesticide contamination in relation to soil properties in the Pearl River Delta. *Science of the Total Environment, China*, v. 447, p. 160–168, 2013.
- YU, H.Y.; WANG, Y.K.; CHENG P.C.; LI, F.B.; CHEN, M.J.; HU, M.; OUYANG, X. X. Effect of nitrate addition on reductive transformation of pentachlorophenol in paddy soil in relation to iron(III) reduction. *Journal of Environmental Management*, v. 132, p. 42 e 48, 2014.
- ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações, São Carlos, *RiMa*, p. 486, 2008.

ZEIGER, E., 1998. Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genotoxicity tests: premises, promises, and performance. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, ed.28, pp. 85–95.

7. ANEXO



TABLE OF CONTENTS

ISSN: 0147-6513

●	Description	p.1
●	Impact Factor	p.1
●	Abstracting and Indexing	p.1
●	Editorial Board	p.1
●	Guide for Authors	p.3

DESCRIPTION

Ecotoxicology and Environmental Safety focuses on integrated mechanistic research related to short- and long-term pathways and interactions of substances and chemical mixtures in environmental systems and subsystems on their bioavailability, and assimilation in organisms, as well as biological responses of these organisms, and damage mechanisms (endocrine disruption, genotoxicity); and on their subsequent fate in the environment, food chain, including humans. Novel technologies, techniques, and methods such as biomarkers, biosensors and bioanalytical systems, bioremediation methods, QSARs and QSPRs, advanced high performance computational methods, models, and their applications in obtaining and processing interdisciplinary ecotoxicological information are also addressed in the journal. We welcome the applied outcome of complex ecotoxicological research such as developing the science-based Environmental Quality Criteria (EQC), standard toxicity tests, techniques, and methods for ecotoxicological evaluation of the environment, as well as developing ecotoxicologically proven methods and technologies for prevention, interception, and remediation of human-induced damage to ecosystems. Emphasis is placed on ecological animal models rather than laboratory based rodent studies; The above scope of the journal is aimed at providing science-based tools for sustainably managing the environment through risk assessment, risk characterization, risk prediction, and risk management. The journal publishes regular research articles, and review articles.

IMPACT FACTOR

2013: 2.482 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

ABSTRACTING AND INDEXING

MEDLINE®
SIIC Data Bases

EDITORIAL BOARD

Editor:

K. Kannan, State University of New York (SUNY) at Albany, Albany, New York, USA

Associate Editors:

R. Handy, Plymouth University, Plymouth, UK

P. Sibley, University of Guelph, Ontario, Ontario, Canada

Emeritus Editor:

F. Korte, Technische Universität München, Attenkirchen, Germany

Editorial Board:

S.B. Agrawal, Banaras Hindu University, Varanasi, India

J. Chen, Dalian University of Technology, Dalian, China

S. Degitz, U.S. Environmental Protection Agency (EPA), Duluth, Minnesota, USA

S.J.S. Flora, Ministry of Defence, Government of India, Gwalior, India

H. Greim, Technische Universität München, München, Germany

M. Hecker, Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA

R.A. Hoke, DuPont Company, Newark, Delaware, USA

T. Iguchi, National Institute for Basic Biology (NIBB), Okazaki Aichi, Japan

H. Iwata, Ehime University, Matsuyama, Ehime, Japan

D. Johnson, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, USA

R. Kookana, CSIRO (The Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization), Glen Osmond, Australian Capital Territory, Australia

Y.-F. Li, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang, China

L.Q. Ma, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

A. Miracle, Pacific Northwest National Laboratory, Richland, Washington, USA

H.-B. Moon, Hanyang University, Ansan, South Korea

H. Nakata, Kumamoto University, Kumamoto, Japan

J. Newsted, ENTRIX Inc, Okemos, Michigan, USA

S. Shaw, Marine Environment Research Institute (MERI), Blue Hill, Maine, USA

L.A. Tremblay, Manaaki Whenua Landcare Research, Lincoln, New Zealand

C.A.M. van Gestel, Vrije Universiteit Amsterdam, Amsterdam, Netherlands

P. Vasseur, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Metz, France

M. Vighi, Università degli Studi di Milano, MILAN, Italy

W.-X. Wang, Hong Kong University of Science & Technology, Kowloon, Hong Kong

P.-K. Wong, Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

[ppyw-gfa-banner.gif](#) your paper your way

INTRODUCTION

Ecotoxicology and Environmental Safety focuses on integrated mechanistic research related to short- and long-term pathways and interactions of toxic substances and chemical mixtures in environmental systems with emphasis on their bioavailability, assimilation and metabolism in target organisms as well as biological responses of these organisms, and damage mechanisms (endocrine disruption, genotoxicity); fates of toxicants in the food chain, including exposures in humans are considered. The journal prefers interdisciplinary studies of environmental chemistry and toxicology describing environmental fate and biological fate of pollutants, novel analytical technologies, techniques, and methods such as biomedical photonic technologies, biomarkers, biosensors, bioanalytical systems, QSARs, QSPRs, advanced high-performance computational methods, models, and their applications in obtaining and processing ecotoxicological information. We welcome the applied outcome of complex ecotoxicological research such as developing the science-based Environmental Quality Criteria (EQC), standard toxicity tests, techniques, and methods for ecotoxicological evaluation of the environment, as well as developing ecotoxicologically proven methods and technologies for prevention, interception, and remediation of human-induced damage to ecosystems. The above scope of the journal is aimed at providing science-based tools for sustainably managing the environment through risk assessment, risk characterization, risk prediction, and risk management. Emphasis will be placed on ecotoxicological animal model studies (rather than rodent models) as well as field studies (rather than controlled laboratory investigations) dealing with fate and effects of pollutants.

In dose-response studies, nominal exposure concentrations of substances not proved by measurements are in general not accepted in EESA, and such manuscripts are being rejected outright. In other words, in experiments dealing with animal exposures, the exposure regimen/concentrations should be environmentally relevant.

Types of paper

The journal publishes regular research articles. Regular research articles must not exceed 8,000 words. Word limit here is for text only. In principle the number of tables and figures should not collectively exceed six. Any exceptions should require approval from editors. Review articles are welcome, but authors are requested to contact the editors for prior approval.

Authors may provide supporting information (for manuscripts exceeding the recommended length), and this material will be made available online.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Ethical statement concerning human and animal subjects is mandatory. For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

For subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is **\$2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

There is no article processing charge for regular article publication, unless you opt for "open access" and 'color printing of figures'.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information. The values reported on research papers should be limited to 3 significant figures, unless required otherwise. Ppm or ppb are not accepted and this should be presented as mg/kg or g/kg. Centrifugation speed should be presented in x g, not rpm.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/ees/>.

If you have difficulty with your submission or any other questions, please contact the Editorial Office:

Ecotoxicology and Environmental Safety
Editorial Office

525 B Street, Suite 1800
San Diego, CA 92101-4495, USA
Telephone: (619) 699-6297
Fax: (619) 699-6850
E-mail: ees2@elsevier.com

Referees

All submitted manuscripts must include a list of five suggested reviewers. Please include the names and contact information (including email addresses) for 5 reviewer suggestions. Typically three of these should be from countries other than those of the authors. Please note that this is a mandatory element of your submission and the Editorial Office cannot locate reviewers on your behalf. If you are unable to suggest potential experts in the field, please refer to your references for possible reviewers.

Additional information

Each manuscript should be accompanied by a letter outlining the basic findings of the paper and their significance.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure your paper has consecutive line numbering - this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use double spacing. All pages must be numbered, beginning with the abstract. All lines must be numbered, preferably continuously throughout the entire manuscript.

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Materials and methods should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced. It is mandatory to give formal assurance that any study involving humans or experimental animals were conducted in accordance with national and institutional guidelines for the *protection of human subjects and animal welfare*. No manuscript will be considered unless this information is supplied.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results/Discussion

Results should be clear and concise. Discussion should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a

separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. Specially please note, the values reported on research papers should be limited to 3 significant figures, unless required otherwise. ppm or ppb are not accepted and this should be presented as mg/kg or g/kg. Centrifugation speed should be presented in x g, not rpm.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. See further under Electronic artwork.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

All citations in the text should refer to:

Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication; *Two authors:* both authors' names and the year of publication; *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Data at PANGAEA

Electronic archiving of supplementary data enables readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in your paper. We recommend that data should be deposited in the data library PANGAEA (<http://www.pangaea.de>). Data are quality controlled and archived by an editor in standard machine-readable formats and are available via Open Access. After processing, the author receives an identifier (DOI) linking to the supplements for checking. As your data sets will be citable you might want to refer to them in your article. In any case, data supplements and the article will be automatically linked as in the following example: [doi:10.1016/0016-7037\(95\)00105-9](https://doi.org/10.1016/0016-7037(95)00105-9). Please use PANGAEA's web interface to submit your data (<http://www.pangaea.de/submit/>).

Interactive plots

This journal encourages you to include data and quantitative results as interactive plots with your publication. To make use of this feature, please include your data as a CSV (comma-separated values) file when you submit your manuscript. Please refer to <http://www.elsevier.com/interactiveplots> for further details and formatting instructions.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal

medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>