



SETAC – Brazil

## New Project

# Avaliação de Áreas Sob a Influência de uma Termelétrica a Carvão Através de Ensaio de Genotoxicidade

F. M. R. DA SILVA JÚNIOR<sup>1,2</sup> & V. M. F. VARGAS<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Divisão de Biologia, Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM), Porto Alegre, Brasil

<sup>2</sup>Centro de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

(Received January 2, 2007; Accepted April 17, 2007)

### RESUMO

Cinzas provenientes da queima de carvão podem apresentar em sua constituição diversas substâncias com potencial genotóxico, incluindo compostos orgânicos e metais pesados. Estas cinzas são lançadas no ambiente por usinas termelétricas e podem contaminar suas áreas adjacentes. No Brasil, não existem trabalhos que avaliem os impactos ambientais em área sob influência de usinas termelétricas a carvão utilizando o ensaio *Salmonella*/microsoma. Desta forma, o objetivo desta pesquisa é avaliar o potencial genotóxico de amostras de solo adjacentes a uma usina termelétrica a carvão e de um depósito de cinzas de carvão em processo de recuperação através deste bioensaio. Amostras de solos superficiais serão coletadas em áreas sob influência de uma usina termelétrica a carvão no estado do Rio Grande do Sul e então serão feitos extratos orgânicos e aquosos para o emprego do ensaio *Salmonella*/microsoma com as linhagens TA98, TA100, TA97a e, possivelmente, YG1021 e YG1024, que permitem definir a presença de nitroderivados. Os resultados obtidos neste trabalho poderão contribuir para implementação deste bioensaio no biomonitoramento de solos.

*Palavras-chave:* amostras de solo, cinzas de carvão, ensaio *Salmonella*/microsoma, extratos aquosos, extratos orgânicos.

### ABSTRACT

#### Evaluation of areas under the influence of a coal-fired power plant through genotoxicity assay

Ashes originated from coal burning may contain in its constitution several substances with genotoxic potential, including organic compounds and heavy metals. These ashes are launched in the environment by power plants and may contaminate its surrounding areas. In Brazil, there are no works evaluating the environmental impacts in the area under influence of coal-fired power plants using the *Salmonella*/microsome assay. Therefore, the aim of this research is to evaluate the genotoxic potential of soil samples adjacent to a coal-fired power plant and of a coal bottom ash deposit in process of recuperation through this bioassay. Superficial soils samples will be collected in areas under influence of a coal-fired power plant in Rio Grande do Sul state, and then organic and aqueous extracts for the *Salmonella*/microsome with the strain TA98, TA100, TA97a and possibly YG1021 and YG1024, which allow the assessment of nitroderivatives. The results of this work may contribute for the implementation of this bioassay in the biomonitoring of soils.

*Key words:* soil samples, coal bottom ash, *Salmonella*/microsome assay, aqueous extracts, organic extracts.

### INTRODUÇÃO

O solo, do ponto de vista de retenção de poluentes, difere dos demais compartimentos ambientais (água e ar) na medida em que inexiste um deslocamento contínuo, como no caso da

circulação atmosférica e dos cursos d'água, podendo acarretar o aumento do tempo de permanência dos contaminantes em nível local. Além disso, o solo funciona como um filtro para águas contaminadas percolantes e como um grande reservatório de gases, a partir de intensos processos físicos, químicos e

\*Corresponding author: Vera Maria Ferrão Vargas, e-mail: ecorisco@fepam.rs.gov.br.

biológicos, necessitando, assim, de cuidados especiais em seu uso (Sisinno & Moreira, 1996; Stenberg, 1999; Costa & Costa, 2004).

Para Gilmore (2001), a contaminação dos solos constitui a maior barreira para o desenvolvimento sustentável, uma vez que este problema afeta a saúde do ecossistema e, diretamente, a diversidade biológica. Entre os principais resíduos contaminantes no solo estão os metais pesados e os compostos orgânicos. A contaminação pelos metais está geralmente associada com o aumento exagerado das atividades industriais e de mineração, enquanto as altas concentrações de compostos orgânicos estão relacionadas com o uso intensivo de produtos agrícolas e de combustíveis fósseis (Wesp *et al.*, 2000; Gilmore, 2001; Esteve-Nunez *et al.*, 2001).

Esses dois grupos de contaminantes têm sido amplamente relatados na literatura como importantes agentes genotóxicos (mutagênicos) em amostras de solo (Knasmüller *et al.*, 1998; Tsukatani *et al.*, 2002; Plaza *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2005), colocando em risco a saúde humana e do meio ambiente. White & Claxton (2004) ressaltam que avaliar a contaminação por substâncias genotóxicas no solo não é tarefa fácil, já que o grande número de substâncias agressivas, potencialmente presentes num sítio contaminado, pode dificultar uma caracterização química, uma vez que este tipo de análise apresenta respostas limitadas para prever a toxicidade de misturas complexas. A utilização de bioensaios, incluindo o *Salmonella* microssoma, se apresenta como uma alternativa útil para medir a mutagênese potencial de misturas ambientais. Este ensaio vem sendo utilizado como um indicador precoce de contaminação por agentes genotóxicos (Umbuzeiro & Vargas, 2003) e, mais recentemente, como indicador de ambientes restaurados por biorremediação (Plaza *et al.*, 2005). Sobre o mesmo tema, pesquisas recentes têm apontado que a associação entre bioensaios, procedimentos de fracionamento de amostras e análises químicas pode ser uma estratégia eficaz para verificar a atuação de misturas complexas no ambiente (Brack, 2003).

Entre essas amostras ambientais complexas que necessitam de maiores estudos estão os solos contaminados com resíduos oriundos da queima de carvão em usinas termelétricas, os quais apresentam, entre outros constituintes, compostos orgânicos provenientes da queima incompleta do carvão e altas concentrações de metais pesados (Borm, 1997; Karuppiah & Gupta, 1997; Pires, 2002). Embora este tema seja de fundamental importância, não existem no Brasil estudos avaliando o potencial genotóxico em áreas sob influência de termelétrica a carvão, através do ensaio *Salmonella*/microssoma, e, além disso, estudos de avaliação de atividade mutagênica em amostras de solo são escassos.

Desta forma, o objetivo deste trabalho será avaliar o potencial genotóxico de amostras de solo adjacentes a uma usina termelétrica a carvão e de um depósito de cinzas de carvão em processo de recuperação através do ensaio *Salmonella*/microssoma, visando à sua utilização em avaliações de solos contaminados por substâncias genotóxicas, como estimativa de impacto ecológico com reflexos na saúde humana.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo será realizado na área de influência de uma usina termelétrica, localizada no estado do Rio Grande do Sul e inserida na Microrregião Carbonífera do Baixo Jacuí. Serão coletadas amostras de solo em locais de amostragem, definidos como críticos para o meio ambiente com reflexos na saúde humana. O trabalho priorizará, além do depósito de cinzas em recuperação, áreas tanto em nível de altitude superior (local de recreação dentro dos limites da usina) quanto inferior a esse (áreas de mata ciliar e destinadas à agricultura adjacentes ao empreendimento), para verificar as possíveis rotas das substâncias com atividade mutagênica, como assoreamento do solo e efeito das chuvas ou poluição atmosférica advinda das chaminés da usina.

Os locais de amostragem serão demarcados com GPS e definidos de forma aleatória, 15 pontos em cada, coletados em uma profundidade de 0-10 cm, sendo removidos os resíduos vegetais. As 15 subamostras serão homogeneizadas a fim de formar uma amostra composta para cada local de amostragem. Em seguida, as amostras serão armazenadas em frascos de vidro a 4°C, transferidas para o laboratório, onde deverão passar pelo processo de secagem à temperatura ambiente por até 48 h, peneiradas (2 mm) e novamente acondicionadas a 4°C até o momento da extração (modificado de Watanabe *et al.*, 2000).

As amostras de solo (15 g) serão submetidas à extração orgânica com diclorometano (200 mL) em dois ciclos de dez minutos pela técnica de ultra-som, sendo seus extratos pré-filtrados, passados em coluna cromatográfica com placa filtrante contendo sulfato de sódio e celite e concentrados em rotavapor, metodologia modificada de Tsukatani *et al.* (2002), pela substituição do metanol pelo diclorometano, uma vez que este solvente é considerado por diversos autores como eficiente na extração de contaminantes mutagênicos (Wesp *et al.*, 2000; Courty *et al.*, 2004), inclusive em misturas complexas ambientais (Nielsen, 1992).

A partir das amostras de solo será também feito um solubilizado aquoso utilizando água destilada estéril (solo: água, 1:2, g mL<sup>-1</sup>), para investigar principalmente a ação genotóxica dos metais pesados. A suspensão será colocada no ultra-som durante dois ciclos de 20 minutos, sendo posteriormente centrifugada a 13.000 × g, por 15 minutos a 4°C, filtrada (0,45 micrômetro), dividida em alíquotas e estocada a 4°C para avaliação da genotoxicidade (Monarca *et al.*, 2002). Essa técnica foi escolhida por ser um procedimento metodológico semelhante à extração orgânica, facilitando comparações posteriores.

Para avaliar a atividade genotóxica dos extratos orgânicos e do solubilizado aquoso será empregado o ensaio *Salmonella*/microssoma no procedimento de pré-incubação em presença e ausência de fração de metabolização hepática (Maron & Ames, 1983). Serão utilizadas as linhagens *Salmonella typhimurium* TA98 e TA97a, que detectam a ação de mutagênicos que causam erro no quadro de leitura, sendo que a TA97a é descrita na literatura como mais sensível a metais pesados (Pagano &

Zeiger, 1992); e a linhagem TA100, que caracteriza o efeito de substituição de pares de bases (Maron & Ames, 1983). Poderão ser utilizadas, para melhor caracterização dos extratos orgânicos, linhagens específicas para definir a presença de nitroderivados: YG1021 e YG1024 (Umbuzeiro & Vargas, 2003).

Para a avaliação da atividade genotóxica, a amostra será considerada positiva se o número de revertentes por placa da amostra for, no mínimo, duas vezes maior que o número de revertentes observado no controle negativo, em presença de curva dose-resposta significativa testada pelo *software* SALANAL (Vargas *et al.*, 1993).

Associada ao estudo de genotoxicidade, será realizada a caracterização química dos metais pesados por espectrometria de absorção atômica e a caracterização dos compostos orgânicos por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa. As respostas obtidas a partir da caracterização química poderão auxiliar a interpretação dos resultados do ensaio biológico, verificando a possível existência de correlações entre a genotoxicidade potencial e as concentrações dos contaminantes ambientais.

## RESULTADOS ESPERADOS

Os dados obtidos neste trabalho poderão contribuir para implementação do ensaio *Salmonella*/microsoma no biomonitoramento de solos contaminados por resíduos de carvão no país, a partir da (i) investigação da atividade genotóxica nas amostras coletadas no depósito de cinzas de carvão em recuperação; (ii) avaliação do potencial genotóxico das amostras de solo das áreas sob influência da usina, quer seja pelo assoreamento do solo, quer seja pela dispersão de poluentes na atmosfera; e (iii) verificação da origem predominante da atividade genotóxica das amostras de solo, a partir da associação entre estudos de caracterização química dos principais grupos de compostos presentes nas amostras ambientais e respostas observadas no marcador biológico para genotoxicidade.

Os resultados desta pesquisa serão divulgados na forma de dissertação no Programa de Pós-Graduação em Ecologia (UFRGS), artigos científicos e apresentação em congressos de áreas correlacionadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORM, P. J. A., 1997, Toxicity and occupational health hazards of coal fly ash (CFA). A review of data and comparison to coal mine dust. *Ann. Occup. Hyg.*, 41(6): 659-676.
- BRACK, W., 2003, Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Anal. Bioanal. Chem.*, 377: 397-407.
- COSTA, M. A. G. & COSTA, E. C., 2004, *Poluição ambiental: herança para gerações futuras*. ORIUM, Santa Maria, 256p.
- COURTY, B., LE CURIEUX, F., MILON, V. & MARZIN, D., 2004, Influence of extraction parameters on the mutagenicity of soil samples. *Mutat. Res.*, 565: 23-34.
- ESTEVE-NÚÑEZ, A., CABALLERO, A. & RAMOS, R., 2001, Biological degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65(3): 335-352.
- GILMORE, E. A., 2001, Critique of soil contamination and remediation: the dimensions of the problem and the implications for sustainable development. *Bull. Sci. Technol. Soc.*, 21(5): 394-400.
- KARUPPIAH, M. & GUPTA, G., 1997, Toxicity of and metals in coal combustion ash leachate. *J. Hazard. Mater.*, 56: 53-58.
- KNASMÜLLER, S., GOTTMANN, E., STEINKELLNER, H., FOMIN, A., PICKL, C., PASCHKE, A., GÖD, R. & KUNDI, M., 1998, Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutat. Res.*, 420: 37-48.
- MARON, D. M. & AMES, B. N., 1983, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 11: 173-215.
- MONARCA, S., FERETTI, D., ZERBINI, I., ALBERTI, A., ZANI, C., RESOLA, S., GELATTI, U. & NARDI, G., 2002, Soil contamination detected using bacterial and plant mutagenicity tests and chemical analyses. *Environ. Res.*, 88: 64-69.
- NIELSEN, P. A., 1992, Mutagenicity studies on complex environmental mixtures: selection of solvent system for extraction. *Mutat. Res.*, 276: 117-123.
- PAGANO, A. D. & ZEIGER, E., 1992, Conditions for detecting the mutagenicity of divalent metals in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mol. Mutag.*, 19: 139-146.
- PIRES, M. J. R., 2002, Emissões oriundas da combustão do carvão, pp. 253-274. In: E. C. Teixeira & M. J. R. Pires (coord.), *Meio ambiente e carvão: impactos da exploração e utilização*, FEPAM, Porto Alegre, 498p.
- PLAZA, G., NALECZ-JAWECKI, G., ULFIG, K. & BRIGMON, R. L., 2005, Assessment of genotoxic activity of petroleum hydrocarbon-bioremediated soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 62: 415-420.
- SISSINO, C. L. S. & MOREIRA, J. C., 1996, Avaliação da contaminação e poluição ambiental na área de influência do aterro controlado do Morro do Céu, Niterói, Brasil. *Cad. Saúde Púb.*, 12(4): 515-523.
- STENBERG, B., 1999, Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicator. *Soil Plant. Sci.*, 49: 263-272.
- TSUKATANI ET, H., TANAKA, Y., SERA, N., SHIMIZU, N., KITAMORI, S. & INOUE, N., 2002, Mutagenic activity in roadside soils. *J. Toxicol. Sci.*, 27(3): 183-189.
- UMBUZEIRO, G. & VARGAS, V. M. F., 2003, Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos, pp. 81-112. In: Ribeiro, L. R., Salvadori, D. M. F., Marques, E. K. (orgs.), *Mutagênese ambiental*, 1. ed., ULBRA, Canoas, 356p.
- VARGAS, V. M. F., MOTTA, V. E. P. & HENRIQUES, J. A. P., 1993, Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat. Res.*, 319: 31-45.
- WATANABE, T., GOTO, S., MATSUMOTO, Y., ASANOMA, M., HIRAYAMA, T., SERA, N., TAKAHASHI, Y., ENDO, O., SAKAI, S. & WAKABAYASHI, K., 2000, Mutagenic activity of surface soil and quantification of 1,3-, 1,6-, and 1,8-dinitropyrene isomers in soil in Japan. *Chem. Res. Toxicol.*, 13: 281-286.
- WATANABE, T., HASEI, T., TAKAHASHI, T., ASANOMA, M., MURAHASHI, T., HIRAYAMA, T. & WAKABAYASHI, K., 2005, 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.*, 18: 283-289.
- WESP, H. F., TANG, X. & EDENHARDER, R., 2000, The influence of automobile exhausts on mutagenicity of soils: contamination with, fractionation, separation, and preliminary identification of mutagens in the *Salmonella*/reversion assay and effects of solvent fractions on the sister-chromatid exchanges in human lymphocyte cultures and in the in vivo mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutat. Res.*, 472: 1-21.
- WHITE, P. A. & CLAXTON, L. D., 2004, Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutat. Res.*, 567: 227-345.

