

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

Tese de Doutorado

Área contaminada: avaliação da genotoxicidade ambiental e
populacional

MARIANA VIEIRA CORONAS

Porto Alegre

2012

Área contaminada: avaliação da genotoxicidade ambiental e populacional

Mariana Vieira Coronas

Tese de Doutorado 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 Doutora em Ciências com ênfase em Ecologia.

Orientadora: Dra. Vera Maria Ferrão Vargas

Co-orientadora: Profa. Dra. Daisy Maria Favero Salvadori

Comissão Examinadora:

Prof. Dra. Juliana da Silva

Dra. Izabel Vianna Villela

Prof. Dra. Teresinha Guerra

Porto Alegre

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Coronas, Mariana Vieira

Área contaminada: avaliação da genotoxicidade ambiental e populacional / Mariana Vieira Coronas. -- 2012.

140 f.

Orientadora: Vera Maria Ferrão Vargas.

Coorientadora: Daisy Maria Favero Salvadori.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Mutagenicidade. 2. Ensaio Salmonella/microsoma. 3. PM2,5. 4. Poeira de sótão. 5. Exposição ambiental.. I. Vargas, Vera Maria Ferrão, orient. II. Salvadori, Daisy Maria Favero, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

*Dedico essa tese à Vida!
Incríveis formas de manifestações
Infinitas possibilidades de adaptações
Resistente e persistente
Delicada individualmente*

Agradecimentos

Essa longa jornada necessária à realização do projeto de doutorado acaba por revelar não apenas superações pessoais, mas grandes parceiros e auxiliares fundamentais nas várias etapas desse trabalho. Expresso meus sinceros agradecimento e reconhecimento:

À Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM);

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, seus docentes, discentes e funcionários;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

Ao INAGEMP - Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (auxílio CNPq 573993/2008-4) pelo apoio a este projeto

À minha orientadora Vera Maria Ferrão Vargas pelo apoio e cobrança balanceados, necessários à realização do trabalho;

À minha co-orientadora Daisy Maria Favero Salvadori e sua equipe no Departamento de Patologia na Faculdade de Medicina da UNESP que muito auxiliaram com as dúvidas em relação a técnica do ensaio e interpretação dos dados;

Às Dras. Juliana Silva, Izabel Vianna Villela e Teresinha Guerra pelo aceite em examinar e contribuir para melhoria desse trabalho, em especial nessa época do ano geralmente confusa e com muitas atividades;

A todos os colegas e amigos que passaram ao longo desses anos pelo Laboratório de Análises Moleculares e Mutagênese Ambiental da FEPAM, em especial a Priscila

Kern (Pri!), Mateus de Oliveira Negreiros, Camila Alves, Roberta Pohren,
Cristiani Rigotti Vaz, Paula Hauber Gameiro, Juliana Rossato

Aos amigos especiais que muito além de jornadas de laboratório, ideias e dúvidas científicas divididas, compartilhamos anseios e dificuldades pessoais, momentos alegres e conquistas: Jocelita Aparecida Vaz Rocha, Andréia Torres de Lemos, Flávio Manoel Rodrigues Junior, Tatiana da Silva Pereira, Kelly Cristina Tagliari de Brito, muito obrigada!

A Secretaria Municipal de Saúde de Triunfo, em especial a equipe do posto municipal de saúde de Barreto que foram fundamentais nas coletas;

À Prof. Dra. Jandyra Maria Guimarães Fachel e sua equipe do Departamento de Estatística, Instituto de Matemática da UFRGS, pelo auxílio estatístico;

À Hedy Hofmann pela revisão no inglês do artigo 1;

Aos funcionários e estagiários da Divisão de Biologia da FEPAM em especial a Clarice Torres de Lemos e Emilene Arusievicz;

Às equipes de Amostragem e da Qualidade do Ar da FEPAM;

Aos meus familiares e amigos, pessoas fundamentais na minha vida e grande parte do que sou;

Aos pequenos e muito valentes voluntários!

RESUMO

O processo de tratamento da madeira utiliza substâncias que geram compostos perigosos que podem contaminar os compartimentos ambientais. O presente estudo avaliou uma área sob influência da contaminação de solo proveniente das atividades de uma usina de tratamento de madeira desativada. A presença e o efeito de compostos mutagênicos em amostras ambientais foram utilizados como marcadores de exposição associada à avaliação de marcadores genéticos de efeito precoce em humanos, com foco em crianças como grupo sensível. Uma área 1750 m distante da usina, fora do quadrante dispersão preferencial atmosférica e em oposição à drenagem do local, foi utilizada como local de referência para a coleta de amostras e comparação. Extratos orgânicos de água de abastecimento, poeira de sótão e material particulado atmosférico fino (PM_{2,5}) foram avaliados para mutagenicidade por meio do ensaio *Salmonella*/microsoma. Cobre (Cu), cromo (Cr), arsênio (As) e pentaclorofenol (PCP) foram quantificados em amostras de poeira do sótão. Os 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) prioritários foram avaliados nos extratos de PM_{2,5} e poeira do sótão. Crianças residentes no entorno da usina e na área de referência foram avaliadas quanto à presença de micronúcleos em amostras de sangue e mucosa oral, e danos primários no DNA, pelo ensaio cometa em linfócitos de sangue periférico. De acordo com a análise de metais, as residências perto da entrada da usina foram as mais afetadas. PCP foi identificado em amostras de poeira de sótão (0,49 mg/kg) e a concentração total de HPAs nesta matriz variou 0,40-13,31 mg/g, com maior dispersão. Todas as amostras de poeira do sótão em que a concentração total de HPAs estava acima de 2µg/g apresentaram resposta positiva para a atividade mutagênica. A contribuição dos HPAs para a mutagênese na poeira de sótão representou 10%, indicando que outros compostos podem contribuir para o efeito mutagênico. A atividade mutagênica e a concentração de HPAs nas amostras de PM_{2,5}

foram, de maneira geral, mais elevadas na área de risco, embora em alguns períodos de amostragem a área de referência atingiu valores semelhantes ou mesmo superiores. O efeito mutagênico e as concentrações de HPAs observados nas amostras de PM_{2,5} foram semelhantes aos valores encontrados em estudos que avaliaram áreas urbanas e com influência industrial. Extratos orgânicos de água de abastecimento não apresentaram mutagenicidade. As frequências de MN em linfócitos de sangue periférico e de células binucleadas na mucosa oral foram significativamente maiores no grupo de risco. Nos demais biomarcadores avaliados não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. O conjunto de resultados indica a necessidade de novas avaliações utilizando grupo de referência menos suscetível às influências da área contaminada. O conjunto de dados coletados neste estudo indica a necessidade de uma avaliação mais cuidadosa dos biomarcadores individualmente e de um grupo de referência menos suscetível a influências da área contaminada. Apesar da ausência de diferenças significativas entre os grupos de risco e de referência em biomarcadores de danos no DNA avaliados em crianças, os resultados observados nas amostras de poeira de sítio e PM_{2,5} sugerem que a população esteve ou ainda está potencialmente exposta a substâncias capazes de causar efeitos adversos à saúde humana.

Palavras chave: mutagenicidade, PM_{2,5}, poeira de sítio, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, ensaio *Salmonella*/microsoma, exposição ambiental, ensaio cometa, ensaio do micronúcleo, tratamento de madeira.

ABSTRACT

Wood treatment process uses substances that generate hazardous compounds that may contaminate environmental compartments. The present study assessed an area influenced by soil contamination originated from the activities of a disabled wood treatment plant. The presence and effect of mutagenic compounds in environmental samples were used as markers of exposure associated to evaluation of early effect genetic biomarkers in human population, focusing on children as sensitive group. An area 1750 m away from the plant, outside the preferential atmospheric dispersion quadrant and in opposition to the site's drainage, was used as a reference area for samples collection and comparison. Organic extracts from supply water, attic dust and fine airborne particulate matter (PM_{2.5}) were evaluated for mutagenicity through *Salmonella*/microsome assay. Copper (Cu), chromium (Cr), arsenic (As) and pentachlorophenol (PCP) were measured in attic dust samples. The 16 priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) were evaluated in PM_{2.5} and attic dust extracts. Children living in the vicinity of the plant and in the reference area were evaluated for the presence of micronuclei in blood and oral mucosa samples, and for primary DNA damage by comet assay in peripheral blood lymphocytes. According to metals analysis, the residences close to the entrance to the plant were the most affected. PCP was identified in attic samples (0.49 mg/kg) and the total PAHs content in this matrix ranged from 0.40 to 13.31 µg/g with greater dispersion. All attic dust samples in which the total PAHs content were above 2µg/g showed mutagenic activity. The contribution of PAHs to mutagenesis in the attic dust represented 10%, indicating that other compounds may contribute to the mutagenic effect. The mutagenic activity and the concentration of PAHs in PM_{2.5} samples were generally higher in the risk area, although in some periods the reference area has reached similar or even higher values.

The mutagenic effect and the concentrations of PAHs recorded in the PM_{2.5} samples were similar to those found in studies that assessed areas of intense urban occupation and industrial influence. Organic extracts from supply water showed no mutagenicity. The MN frequencies in peripheral blood lymphocytes and binucleated cells of the oral mucosa were significantly higher in the risk group. No significant differences between children from the reference and risk area were observed in others genetic biomarkers assessed. The result set indicates the need for further evaluations using reference group less susceptible to the influences of the contaminated area. The set of data collected in this study indicates the need for a more cautious assessment of biomarkers individually, and a reference group less susceptible to influences from the contaminated area is necessary. Despite the absence of significant differences between the risk and reference groups in biomarkers of DNA damage assessed in children, the results in attic and PM_{2.5} samples suggest that the population was or is still potentially exposed to substances with strong negatives effects on human health.

Key-words: mutagenicity, PM_{2.5}, attic dust, polycyclic aromatic hydrocarbons, *Salmonella*/microsome assay, exposição ambiental, comet assay, micronucleus assay, wood treatment.

LISTA DE ABREVIACOES

Portugus/Ingls

2AF	2 -aminofluoreno
2NF	2-nitrofluoreno
4NQO	4-nitroquinolina-1-xido
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
AZS	Azida sdica
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfxido
FEPAM	Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler
HPA /PAH	Hidrocarboneto Policclico Aromtico
IARC	International Agency for Research on Cancer
MN	Micronúcleo
MOE/EOM	Matéria Orgânica Extraída
PCP	Pentaclorofenol
PM10	Material particulado inalável (<10µm diâmetro aerodinâmico)
PM2,5	Material particulado fino (<2,5µm diâmetro aerodinâmico)
PTS	Partículas Totais em Suspensão (<100µm diâmetro aerodinâmico)
S9	Fração de metabolização de mamífero <i>in vitro</i>

LISTA DE FIGURAS

Introdução

- Figura 1** Principais classes de biomarcadores medidos entre o percurso da exposição ao efeito adverso. (Adaptado a partir de National Research Council, 1987) 2
- Figura 2** Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) apontados como poluentes ambientais prioritários pela USEPA. Os nomes sublinhados são os HPAs classificados pela IARC como grupo 1 (carcinogênico para humanos: benzo[a]pireno), grupo 2A (provavelmente carcinogênico para humanos: dibenzo(ah)antraceno) e grupo 2B (possivelmente carcinogênico para humanos: naftaleno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, indeno[1,2,3-cd]pireno) 8
- Figura 3** Localização da área estudada 11
- Figura 4** Representação dos tipos celulares avaliados no ensaio de micronúcleo. A partir de Holland et al. (2008) e Thomas et al. (2009) 19
- Figura 5** Imagens de células da mucosa oral com danos e alterações nucleares dos indivíduos analisados: (A) normal diferenciada, (B) cariorréxe, (C) picnose, (D) cariólise, (E) célula com micronúcleo e (F) célula binucleada 20
- Figura 6** Análise da estimativa de danos por imagem utilizando microscopia de fluorescência integrada ao programa computacional *Comet Assay IV* 22

Artigo 1 Attic dust assessment near a wood treatment plant: past air pollution and potential exposure

Artigo 1 *Avaliação da poeira de sótão próximo a uma usina de tratamento de madeira: poluição atmosférica passada e exposição potencial*

Figure 1 - Location of the studied area and residences where attic dust samples were collected based on the location of the autoclave, the two concentric circles delimit 300 and 600 meter radiuses. Samples 10 and 11 (in the reference area) do not appear in this map

Figura 1 *Localização da area estudada e das residências amostradas para poeira de sótão baseadas na localização da autoclave, os dois círculos concêntricos delimitam raios de 300 e 600 m. Amostras 10 e 11 (na área de referência) não aparecem no mapa* 31

Figure 2 - Sum of the 16 PAHs measured in attic dust samples. Carcinogenic PAHs are Naph, B[a]A, Chr, B[b]F, B[k]F, B[a]P, I[cd]P and DB[ah]A, classified as group 1, 2A or 2B by IARC. Acy, Ace, Fln, Phe, Ant, Flt Pyr and B[ghi]P are other PAHs

Figura 2 Somas dos 16 HPAs avaliados nas amostras de poeira de sótão. HPAs carcinogênicos são Naph, B[a]A, Chr, B[b]F, B[k]F, B[a]P, I[cd]P e DB[ah]A classificados pela IARC (2010) nos grupos 1, 2A e 2B. Acy, Ace, Fln, Phe, Ant, Flt Pyr and B[ghi]P são outros HPAs 40

Figure 3 - Mutagenic potency (revertants/g) for attic dust extracts in *Salmonella*/microsome assay for TA98 strain

Figura 3 Potencial mutagênico (revertentes/g) da poeira de sótão no ensaio Salmonella/microsossoma para linhagem TA98 46

Artigo 2 Avaliação de área contaminada por atividades de tratamento de madeira: monitoramento humano e ambiental por meio biomarcadores genéticos

Figura 1 Localização da área estudada 65

Figura 2 Figura 2 Localização da área estudada, dos amostradores de grandes volume de ar para PM_{2,5} e dos pontos de captação e da estação de tratamento de água..... 66

Figura 3 Concentração média de partículas de PM_{2,5} em amostragens de 24h para os dois períodos de estudo nas áreas de risco (sob influência de contaminantes da atividade de preservação de madeira) e área de referência no distrito de Barreto, município de Triunfo, RS..... 75

Figura 4 Concentração de HPAs nos extratos orgânicos no material particulado PM_{2,5} na área de referência e de risco da localidade de Barreto, Triunfo, RS..... 80

Figura 5 Abundância relativa dos HPAs avaliados nos extratos orgânicos material particulado fino (PM_{2.5}) na área de referência e de risco da localidade de Barreto, Triunfo,RS 82

LISTA DE TABELAS

Artigo 1 Attic dust assessment near a wood treatment plant: past air pollution and potential exposure

Table 1 Characteristics of the residences in which attic dust samples were collected in the area under the influence of the wood preservation plant

Tabela 1 Características das residências coletadas poeira de sótão sob influência de uma usina de preservação de madeira 33

Table 1 Time interval and monitored ions of the SIM method

Tabela 1 Intervalo de tempo e íons monitorados no método SIM 35

Table 2 Heavy metals detected in attic dust samples (mg/kg)

Tabela 2 Metais pesados avaliados nas amostras de poeira de sótão (mg/kg) 37

Table 3 Values of the 16 PHS measured in the attic dust samples collected in an area under the influence of a wood preservative plant compared to USEPA Regional Screening Levels for Chemical Contaminants at Superfund Sites and Brazilian National Council of the Environment values for soil.(mg/kg)

Tabela 3 Valores dos 16 HPAs avaliados nas amostras de poeira de sótão coletadas em área sob influência de uma usina de preservação de madeira comparados aos valores dos níveis regionais de triagem para contaminantes químicos da USEPA e do Conselho Nacional do Meio Ambiente do Brasil para solos 42

Table 4 Predicted mutagenic potency for *Salmonella*/microsome assay for TA98 strain in presence of mammalian metabolic activation (S9 mix) based on the concentration and mutagenic potency of PAHs

Tabela 4 Potencial mutagênico predito para ensaio Salmonella/microsossoma para linhagem TA98 em presença de ativação metabólica de mamífero in vitro (S9 mix) baseadas na concentração e no potencial mutagênico dos HPAs 49

Artigo 2 Avaliação de área contaminada por atividades de tratamento de madeira: biomarcadores genéticos ambientais e na população humana

Tabela 1 Mutagenicidade em linhagens de <i>S. typhimurium</i> por unidade de massa de matéria orgânica extraída (revertentes/ μg) e por volume de ar amostrado (revertentes/ m^3) nos extratos orgânicos de $\text{PM}_{2,5}$ para os dois períodos de estudo nas áreas de risco (sob influência de contaminantes da atividade de preservação de madeira) e área de referência no distrito de Barreto, município de Triunfo, RS	77
Tabela 2 Valores médios (média \pm erro padrão) de danos primários no DNA (<i>tail intensity</i>) e de micronúcleos (MN) em linfócitos periféricos de crianças residentes na área de risco e de referência em Barreto, Triunfo, RS	85
Tabela 3 Tabela 3 Frequência (%) de micronúcleo (MN) e de alterações nucleares em células de mucosa oral de crianças residentes na área de risco e referência em Barreto, Triunfo, RS	86
Material suplementar - Tabela 1 Concentração de partículas, matéria orgânica extraída (MOE), concentração de HPAs e mutagenicidade na linhagem TA98 de <i>S. typhimurium</i> em extratos orgânicos de filtros em conjunto (<i>pool</i>) e isolados de $\text{PM}_{2,5}$ nas áreas de risco (sob influência de contaminantes da atividade de preservação de madeira) e área de referência no distrito de Barreto, município de Triunfo, RS	97

SUMÁRIO

Agradecimentos	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIACÕES	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Área de Estudo	9
1.2 Marcadores Ambientais	13
1.3 Biomarcadores genéticos na população	17
1.4 Estruturação da tese	22
2. Attic dust assessment near a wood treatment plant: past air pollution and potential exposure	24
1. Introduction	27
2. Material and Methods	29
3. Results and discussion	36
4. Conclusions	51
3. Avaliação de área contaminada por atividades de tratamento de madeira: biomarcadores genéticos ambientais e na população humana	58
1. Introdução	61
2. Material e Métodos	64
3. Resultados e Discussão	74
4. Conclusões	87
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
APÊNDICES	

1. INTRODUÇÃO

A expansão humana sobre o ambiente, ocasionando sua modificação, seja pela supressão do ambiente anterior, quanto pela instalação de processos produtivos, tem gerado prejuízos aos ecossistemas e a própria sociedade, aumentando as desigualdades socioambientais. Diante desse cenário, novas abordagens e tecnologias se tornam essenciais para identificação e minimização desses impactos. Nesse contexto, parâmetros de avaliação e diagnóstico ambiental são fundamentais para avaliar e prevenir os efeitos das atividades humanas e seus reflexos na saúde do ecossistema e da população humana.

Marcadores de eventos biológicos, biomarcadores, que têm sido bastante empregados com objetivo de avaliação de exposição ocupacional, estão sendo utilizados para investigação dos efeitos causados por misturas complexas de origem ambiental devido a melhoria da medição e precisão analítica (Ryan et al., 2007). A investigação da exposição humana à contaminação ambiental utilizando metodologias genéticas é um eficiente sistema de advertência para doenças

Biomarcadores são parâmetros observáveis em um *continuum* desde a exposição até a manifestação do efeito adverso à saúde (Figura 1) indicando eventos nos sistemas biológicos. De maneira geral, biomarcadores são classificados de acordo com seus usos principais em três grupos: de exposição, efeito e susceptibilidade (Silins & Högberg, 2011), muitas vezes pode ocorrer sobreposição dependendo do parâmetro avaliado (Figura 1). Entre os biomarcadores de efeito, os marcadores genéticos se destacam por serem capazes de identificar efeitos precoces, alguns ainda passíveis de reparo, e por isso ficando entre o limiar de marcação entre a exposição e o efeito. Assim, a

informação fornecida por esses biomarcadores permite que medidas preventivas sejam tomadas em tempo hábil.

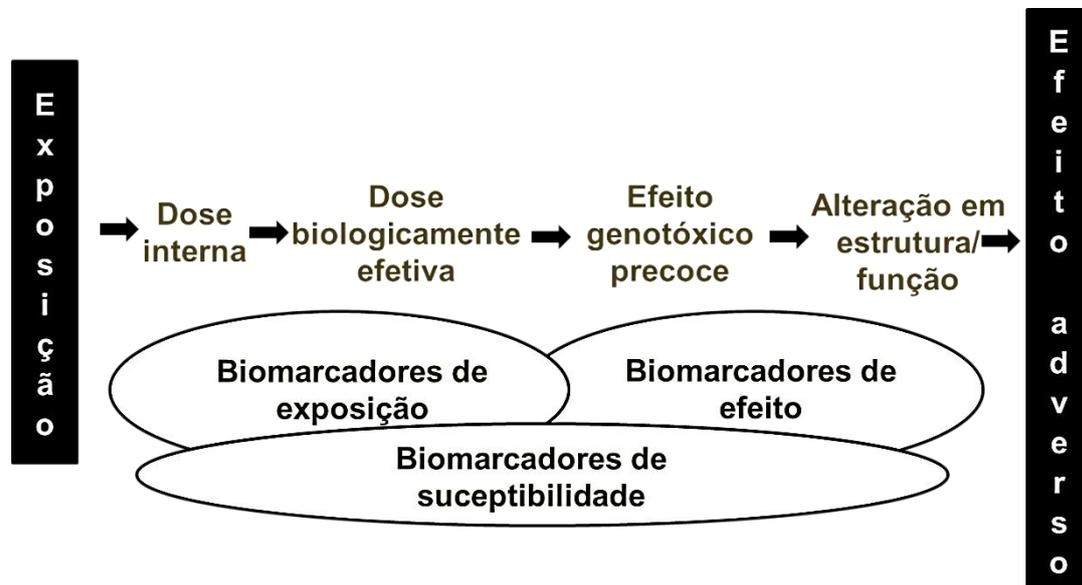


Figura 1 Principais classes de biomarcadores medidos entre o percurso da exposição ao efeito adverso. (Adaptado a partir de National Research Council, 1987).

Na avaliação de exposição ambiental, a escolha do parâmetro medido deve considerar as fontes potenciais de contaminação, a dinâmica e propriedades das substâncias no ambiente. Além disso, o grupo de organismos escolhidos também é elemento importante a ser considerado. Pois, apesar da exposição ser similar para população, os riscos associados serão distintos nos diferentes estágios de desenvolvimento (Pohl & Abadin, 2008). Nesse contexto, entre os diversos grupos populacionais humanos, as crianças estão entre os mais sensíveis por alguns dos seguintes motivos (Neri et al., 2006a; Salvi, 2007; Pohl & Abadin, 2008):

- Crianças apresentam maior influxo diário de água, comida e ar (por quilograma de peso do corpo) que adultos e por isso podem ter maior ingestão proporcional de contaminantes;

- Crianças estão em fase de rápido crescimento e desenvolvimento e, por isso, os processos fisiológicos são mais facilmente perturbados;
- As taxas e habilidades de detoxificação, metabolização, excreção, proliferação celular e reparo no DNA nas crianças diferem dos adultos;
- Fisiologicamente, crianças estão mais susceptíveis a danos neurológicos causados pela exposição aos produtos químicos nocivos;
- O epitélio do sistema respiratório de crianças em crescimento é mais permeável;
- O comportamento, como o de levarem objetos e a mão à boca, se exercitarem mais, ficarem mais tempo em ambientes externos, entre outros contribui para maior exposição;
- O fato de permanecerem mais tempo na mesma região com menor deslocamento que adultos agravam a exposição.

Uma extensa revisão para estudos avaliando biomarcadores de dano genéticos em crianças expostas a poluição ambiental destacou que micronúcleo e aberrações cromossômicas foram marcadores sensíveis a esse grupo e tipo de exposição (Neri et al., 2006b). Entretanto, devido ao baixo número de publicações revisadas por esses autores utilizando o ensaio cometa, nenhuma conclusão foi possível sobre a sensibilidade desse marcador nesse tipo de abordagem.

A análise de micronúcleo (MN) é um método citogenético eficiente para a avaliação de alterações cromossômicas. O MN é formado por fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo no momento da mitose (Fenech & Bonassi, 2011). O teste para detecção do micronúcleo tem sido sensível ao efeito da contaminação nos diversos compartimentos ambientais (Bonassi et al., 2006; Holland et al., 2008; Fenech et al., 2011). Uma avaliação em local

contaminado principalmente por bifenil policlorado e metais pesados, após o ataque aéreo a uma montadora de carros na Sérvia, identificou que a frequência de micronúcleos em linfócitos de recém-nascidos foi maior comparada ao grupo controle (Milošević-Djordjević et al., 2005). Outro estudo avaliando 65 crianças e suas mães, em Oakland, Califórnia (EUA) encontrou uma associação entre a frequência de micronúcleo em células esfoliadas de mucosa oral e em linfócitos com níveis regionais de ozônio nos dois grupos (Huen et al., 2006). Esses autores ainda observaram que somente nas crianças também foi identificada uma associação com a intensidade do trânsito, sugerindo uma maior sensibilidade deste grupo (Huen et al., 2006). Na Alta Silésia, Polônia, pesquisadores avaliaram os efeitos genotóxicos em 74 crianças devido a exposição à misturas ambientais complexas utilizando diversos biomarcadores de exposição e efeito, e entre esses últimos e a indução de micronúcleo em linfócitos de sangue periférico (Mielzzynska et al., 2006).

Trabalhos utilizando o ensaio do cometa em amostras de crianças são mais restritos. Na cidade do México, afetada por altos índices de poluição atmosférica, células do epitélio nasal de crianças que ocupam essa área poluída apresentaram mais danos no DNA do que o grupo controle, composto por crianças residentes em uma área com baixos níveis de poluição (Calderón-Garcidueñas et al., 1999). Já outra pesquisa, tentando avaliar o efeito da poluição atmosférica em fetos, utilizando células brancas do sangue periférico e do cordão umbilical de grávidas, não encontrou diferença significativa entre a população alvo e a controle (Sram et al., 1998). Neste caso os autores ressaltam a sensibilidade dos diferentes tipos celulares ao ensaio, concluindo que linfócitos isolados parecem ser mais sensíveis, principalmente em baixas dosagens de mutágenos (Sram et al., 1998).

A combinação desses dois métodos, micronúcleo e cometa, permitem, portanto, a detecção de maior espectro de alterações genéticas, uma vez que o primeiro traz informações de danos citogenéticos que não são passíveis de reparo e o ensaio do cometa, lesões moleculares que indicam a capacidade do agente atingir o DNA que são ainda passíveis de reparo. Somado à avaliação populacional, uma análise que identifique a presença de substâncias no ambiente e o efeito biológico da mistura possibilita uma abordagem mais adequada para um diagnóstico e monitoramento ambiental, permitindo uma identificação mais clara de quais são as causas do efeito observado. Uma vez que os métodos mais diretamente associados à saúde humana levam a conclusões mais relacionadas ao efeito, outros métodos, como a análise química e a avaliação de mutagenicidade, fornecem informações sobre os mecanismos de ação e são mais facilmente utilizados em comparações (Claxton et al., 2004; Claxton & Woodall Jr, 2007).

A identificação de substâncias nocivas originadas dos processos antropogênicos é fundamental para a regulação e gestão ambiental na busca da manutenção dos processos ecológicos e saúde ambiental. No entanto, a avaliação de misturas complexas pode se tornar um trabalho infundável e incompleto devido às possibilidades de reações e transformações da matéria. Neste contexto a identificação de parâmetros simples e eficazes, mas que expressem essa complexidade se torna fundamental na prevenção e controle ambiental.

O material particulado atmosférico é uma mistura complexa formada por partículas orgânicas e inorgânicas que ficam em suspensão. Normalmente são classificadas e avaliadas conforme seu tamanho aerodinâmico em Partículas Totais em Suspensão (PTS), partículas de até 100 μ m, Partículas Inaláveis (PM10), menores que 10 μ m, Partículas Finas Inaláveis (PM2,5) menores que 2,5 μ m, e Ultra Finas (UF),

menores que $0,1\mu\text{m}$ (Lemos et al., 2012). A avaliação da concentração de material particulado presente na atmosfera é um indicador da qualidade ambiental. No Brasil são estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) limites de concentração para PTS e PM10 (Quadro 1). No entanto, essa norma já está bem defasada, pois além de não considerar as frações menores, que estão mais relacionadas a maiores prejuízos aos organismos por concentrarem os compostos nocivos presentes no ar (De Martinis et al., 1999; Claxton et al., 2004; Coronas et al., 2008; Vargas et al., 2011; Lemos et al., 2012), os limites estabelecidos não garantem um nível seguro para minimização de efeitos adversos (Coronas et al., 2009; Pereira et al., 2010; Vargas et al., 2011; Lemos et al., 2012). Além disso, concentrações de PTS ou PM10 como um índice da qualidade do ar podem não representar ou estar relacionados com a concentração das partículas que chegam a parcelas alveolares do pulmão (Claxton et al., 2004).

Quadro 1 Padrões Nacionais de Qualidade do Ar estabelecidos na Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente Nº 003 de 1990.

PADRÕES NACIONAIS DE QUALIDADE DO AR Resolução CONAMA nº. 03 de 28/06/1990			
Poluente	Tempo de Amostragem	Padrão Primário µg/m³	Padrão Secundário µg/m³
Partículas Totais em Suspensão (PTS)	24 horas*	240	150
	MGA**	80	60
Partículas Inaláveis (PM10)	24 horas*	150	150
	MAA***	50	50
Fumaça	24 horas*	150	100
	MAA***	60	40
Dióxido de Enxofre (SO₂)	24 horas*	365	100
	MAA***	80	40
Dióxido de Nitrogênio (NO₂)	1 hora*	320	190
	MAA***	100	100
Monóxido de Carbono (CO)	1 horas*	40.000	40.000
		35 ppm	35 ppm
	8 horas*	10.000	10.000
		9 ppm	9 ppm
Ozônio (O₃)	1 horas*	160	160
* Não deve ser excedido mais que uma vez ao ano. ** Média geométrica anual. *** Média aritmética anual. **** A resolução permite a utilização de método equivalente.			

A importância do estudo das frações menores vai além da relevância para saúde, pois muitos compostos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), estão preferentemente associados com partículas menores que 1 µm (Lopes & Andrade, 1996). Estudos também demonstraram que PM_{2,5} apresentam relativamente mais HPAs total e carcinogênicos do que PM₁₀ (Claxton & Woodall Jr, 2007).

Os HPAs são formados durante a combustão incompleta ou pirólise de materiais contendo carbono e hidrogênio, como gás, madeira, óleo, combustíveis fósseis, etc, e, por isso, geralmente ocorrem como misturas complexas, e não isoladamente. Existem mais de 100 HPAs (ASTDR, 1995) e 16 são listados como poluentes prioritários no monitoramento ambiental pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

(USEPA), e desses oito são listados pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC) pelo seu potencial genotóxico (IARC, 2010) (Figura 2). Essas substâncias estão presentes por todo o ambiente, ar, água e solo. Na atmosfera são encontrados tanto no estado gasoso, quanto associado às partículas.

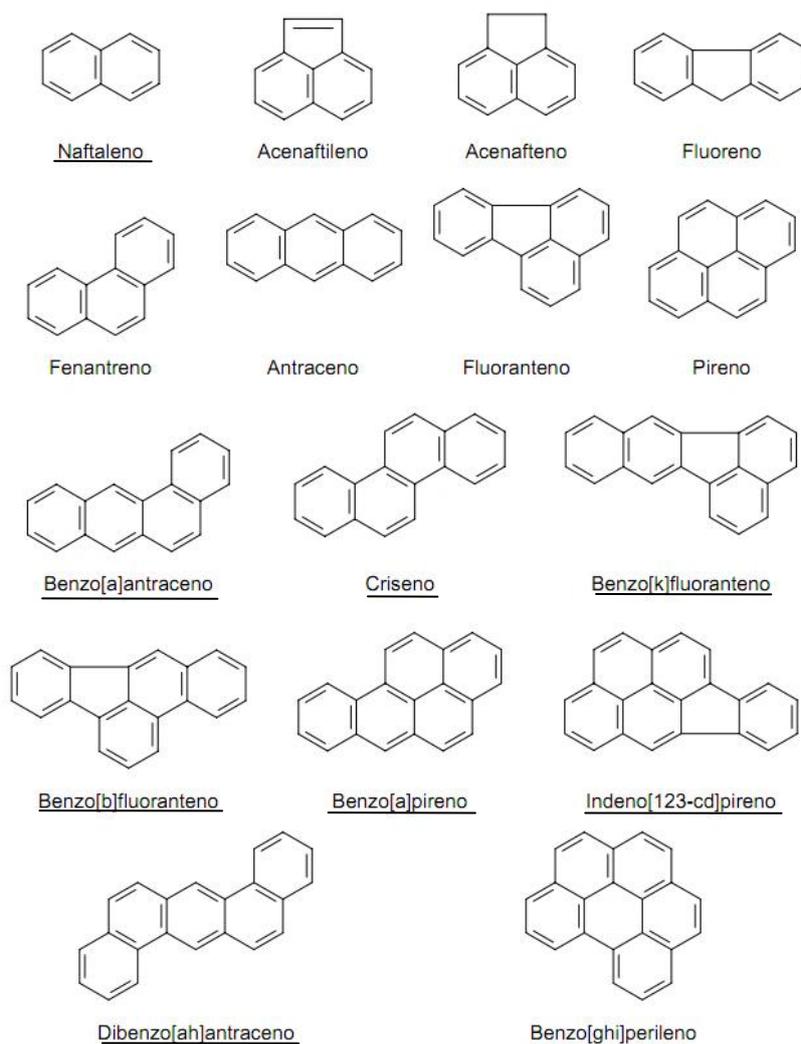


Figura 2 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) apontados como poluentes ambientais prioritários pela USEPA. Os nomes sublinhados são os HPAs classificados pela IARC como grupo 1 (carcinogênico para humanos: benzo[a]pireno), grupo 2A (provavelmente carcinogênico para humanos: dibenzo(ah)antraceno) e grupo 2B (possivelmente carcinogênico para humanos: naftaleno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, indeno[1,2,3-cd]pireno).

Assim, a investigação das frações menores do material particulado do ar é importante para estimar o perigo de exposição. Além disso, a avaliação do efeito biológico de misturas complexas, como o material particulado, permite o adequado diagnóstico e manejo do ambiente e organismos afetados.

O objetivo geral da presente tese de doutorado foi identificar a presença de mutagênese em amostras ambientais como marcador de exposição aliada à avaliação de marcadores de danos genéticos na população humana, com foco em crianças, residentes no entorno de uma área que apresenta contaminação do solo por substâncias utilizadas na preservação madeira. Os objetivos específicos foram: a) avaliar a possível rota de dispersão atual e passada dos poluentes por via atmosférica; b) utilizar a presença de mutagênese no material particulado fino inalável (PM_{2,5}) como marcador de exposição ambiental; c) investigar a presença de contaminantes mutagênicos em extratos orgânicos de material particulado inalável do ar e a contribuição de nitrocompostos e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) nessa atividade; d) comparar as populações alvos e de referência escolhidas em relação as suas localizações geográficas tendo como parâmetro a pluma de dispersão de poluentes atmosféricos originados nos sítios contaminados; e) realizar avaliação de danos no DNA provocados pela exposição aos contaminantes mutagênicos presentes no ambiente em humanos

1.1 Área de Estudo

A área estudada apresenta contaminação de solo específica (preservantes de madeira) relatada em estudo de impacto ambiental na Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM), com análise de risco elaborada por empresa especializada (FEPAM 2010a,b). Essas avaliações iniciais efetuadas pelo

empreendedor mostraram a presença de diferentes grupos de compostos orgânicos e de metais pesados na água subterrânea e no solo.

A área encontra-se na Depressão Central Gaúcha, estando próximo à confluência dos rios Taquari e Jacuí, nas partes mais baixas de suas calhas fluviais, apresentando colinas suaves com cotas que não ultrapassam 100 m. O local é percorrido por corpos d'água associados, em direção à drenagem principal, formando sub-bacias. O terreno é plano, com pequena declividade no sentido oeste-noroeste. O local é geologicamente caracterizado por sedimentos aluvionares recentes, constituindo um pacote de cascalhos intercalados com areia, areias argilosas e argilas. A caracterização geológica e as diferenças de carga hidráulica dos poços de monitoramento instalados na área configuram um aquífero do tipo freático com profundidades do nível d'água entre 1,6 m e 5,0 m aproximadamente.

A empresa relacionada com atividade de preservação de madeira, já desativada, localiza-se à margem esquerda do rio Taquari, no distrito de Barreto, Triunfo, RS (Figura 3). No entorno da unidade existe núcleo habitacional com culturas agrícolas, observando-se alguns estabelecimentos comerciais de pequeno porte (mercados, lojas de material de construção, lojas de roupas, bares e lanchonetes). Na margem direita do rio, o uso preponderante é agrícola.

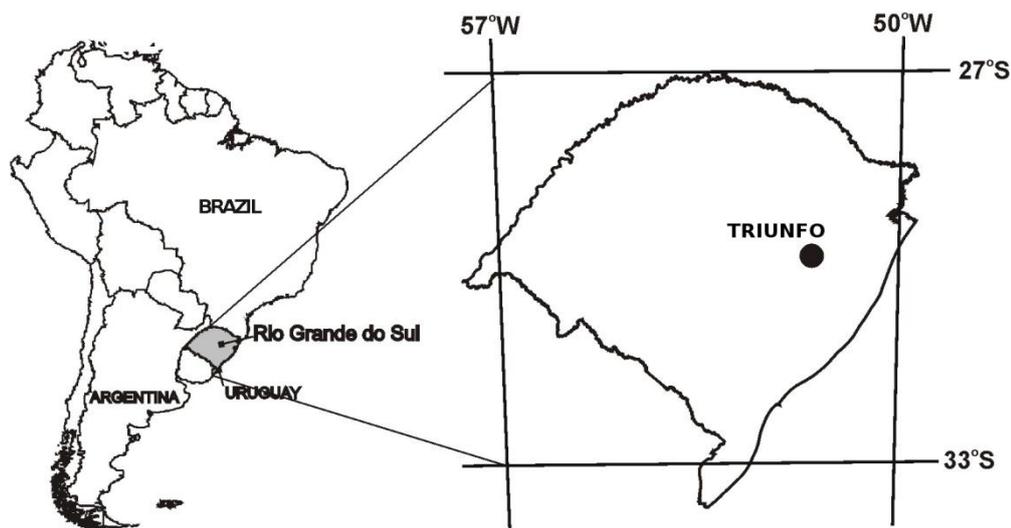


Figura 3 Localização da área estudada.

Em atividade desde 1960, ano em que foi instalado o tratamento da madeira em autoclave, a empresa destina-se a exploração, produção, preservação, fabricação, compra e venda no mercado interno e externo de postes de iluminação elétrica e/ou produtos derivados de madeira. Os produtos químicos usados para tratamento da madeira foram solução de pentaclorofenol em óleo e/ou óleo de creosoto, substituído pelo tratamento alternado do uso de creosoto e o hidrossal CCA (Cobre-Cromo-Arsênio), desde 1982. A partir de 1998, a empresa passou a empregar o hidrossal exclusivamente como preservante no tratamento da madeira até 2005, ano em que encerrou as atividades.

Creosoto é uma mistura complexa que contém centenas de compostos sendo basicamente predominado por hidrocarbonos aromáticos, incluindo HPAs (Gallego et al., 2008). O pentaclorofenol (PCP) é um pesticida organoclarado que apresenta dioxinas e furanos como impurezas. A comercialização e uso de PCP e seus sais para atividades destinadas à preservação da madeira estão proibidos no Brasil desde 2007 (Brasil, 2006). A IARC listou o creosoto como provavelmente carcinogênico para humanos e o PCP como possivelmente carcinogênico para humanos (IARC, 2010). O arseniato de cobre (hidrossal CCA) é composto por cobre, cromo e arsênio, sendo esses

dois últimos metais tóxicos, e o arsênio, compostos de arsênio e o cromo hexavalente (Cr (VI)) são carcinogênico para humanos (IARC, 2010).

O longo tempo de funcionamento da empresa fez com que esta área gerasse um passivo ambiental, já que diversos produtos e metodologias foram empregados, em período de tempo onde essas atividades eram menos controladas. Além disso, resíduos desses produtos permaneceram na lagoa de decantação, nos tanques de armazenamento e no depósito de resíduos. Essa contaminação identificada no local motivou a execução de projetos de estudo e pesquisa interinstitucional e multidisciplinar que avaliou diferentes e potenciais fontes e rotas de dispersão dos poluentes, além da avaliação da população humana residente no entorno (EcoRISCO SAÚDE “Estratégias ecotoxicológicas para caracterizar áreas contaminadas como medida de risco à saúde populacional - EcoRisco Saúde”, aprovado no Edital MCT/CNPq/CT-Saúde nº 18/2006 e EcoRISCO SAÚDE/HIDRO – Projeto aprovado no Edital MCT/CT-SAÚDE/CT-HIDRO/CNPq N ° 45/2008).

Estudos realizados em solos da área interna da usina e de residências do entorno apresentaram contaminação por metais, HPAs, pentaclorofenol, este restrito à solo da área interna, além da presença de atividade mutagênica detectada pelo ensaio *Salmonella*/microsoma (Pohren et al., 2012). As rotas aquáticas de dispersão dos contaminantes desta área foram avaliadas e mostraram que substâncias de efeito genotóxico apresentam a potencialidade de serem levadas até o rio Taquari por escoamento superficial (da Costa et al., 2012).

1.2 Marcadores Ambientais

A avaliação dos marcadores ambientais e populacionais foi realizada na tentativa de identificar o fluxo dos contaminantes e as possíveis vias de exposição. Para isso foi conduzida a investigação na fração PM_{2,5} de partículas atmosféricas, na água destinada ao abastecimento público e em poeira doméstica acumulada nos sótãos das residências. A presença de contaminantes orgânicos e metais pesados foram avaliados, além do potencial efeito mutagênico dessas amostras ambientais. Uma área 1750 m distante da usina, fora do quadrante dispersão preferencial atmosférica e em oposição à drenagem do local, foi utilizada como local de referência para a coleta de amostras e comparação.

1.2.1 Material particulado atmosférico

Na área de estudo foram instalados dois amostradores de grandes volume AGVs da ASI/GMW (Andersen Samplers Inc/General Metal Works) para coleta de partículas de até 2,5 µm em suspensão (PM_{2,5}) no ar ambiente. As amostras eram recolhidas por um período de 24 horas semanalmente em filtros de membrana, constituída por microfibras de vidro de borossilicato puro, reforçada com lã de vidro e com PTFE – Politetrafluoretileno (MFAB TX40HI20-WW). Cada filtro foi pesado antes e após a coleta para determinação da massa de partículas coletadas. O volume de ar amostrado foi determinado a partir da vazão medida e do tempo de amostragem. A concentração de PM_{2,5} foi calculada dividindo-se a massa de partículas coletada pelo volume de ar amostrado, sendo expressa em microgramas por metro cúbico (µg/m³).

A investigação prévia de contaminantes na poeira depositada nas residências do entorno do local contaminado auxiliou a definição dos locais de instalação dos amostradores. A investigação de extratos orgânicos quanto à potência mutagênica no ensaio *Salmonella*/microsoma permitiu estimar o nível de efeito/metro cúbico de ar

amostrado e a presença de nitro e dinitrocompostos, utilizando linhagens específicas. Ainda nesses extratos orgânicos foram quantificados os 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) classificados como poluentes prioritários pela agência ambiental norte-americana (USEPA).

1.2.2 Água destinada ao abastecimento público

Amostras da água antes e após tratamento foram coletadas na Estação de Tratamento de Água que abastece a população residente na área estudada. O ponto de captação da água fica próximo da área da usina de tratamento de madeira, mas a montante desta (29°52'1,76"S, 51°42'42,57"W). Essas amostras foram investigadas quanto à presença de efeito mutagênico.

1.2.3 Poeira doméstica

Amostras de poeira depositadas no forro (sótão) de residências foram coletadas utilizando escovas de cerdas naturais e armazenadas em frascos de vidro. As amostras foram analisadas para determinar a concentração de metais pesados, presença de HPAs e atividade mutagênica na fração orgânica.

1.2.4 Extração dos compostos orgânicos

O material particulado fino (PM_{2,5}) amostrado e poeira doméstica acumulada no sótão foram submetidos à extração com solvente diclorometano (DCM) pela técnica de ultra-som (Vargas et al., 1998) que extrai compostos moderadamente polares, onde se encontra a maior fração e variedade de compostos orgânicos mutagênicos (Claxton et al., 2004). DCM também é utilizado para evitar que compostos não orgânicos potencialmente tóxicos para as bactérias do ensaio sejam extraídos (Marvin & Hewitt, 2007). O percentual de matéria orgânica extraída (MOE%) foi calculado e massa total

obtida na extração comparada ao volume de ar amostrado para determinação da concentração de MOE em $\mu\text{g}/\text{m}^3$ para amostras de PM_{2,5} e para amostras de poeira determinação da concentração em $\mu\text{g}/\text{g}$.

As amostras de água (40 litros) foram processadas sequencialmente por adsorção em resinas do tipo Amberlite XAD4 (1 mL/L de amostra), em pH natural e acidificada pela adição de HCl até pH 2,0. A coluna foi tratada com solventes metanol, éter etílico, diclorometano e água milique (1:1:2:3). A eluição dos compostos em pH natural foi realizada em metanol/diclorometano (1:4) retirando compostos moderadamente polares e apolares. A eluição ácida foi realizada em metanol/etilo acetato, para compostos polares. Os eluatos foram concentrados em rotavapor até um volume de 10mL. A massa obtida foi medida em balança analítica de cinco casas (Cardozo et al., 2006; Pereira et al., 2007).

1.2.5 Ensaio *Salmonella*/microsoma

A mutagenicidade dos extratos (PM_{2.5}, poeira doméstica e água de abastecimento) foi avaliada pelo ensaio *Salmonella*/microsoma (Maron & Ames, 1983), através do método de microsuspenção (Kado et al., 1986). Linhagens de *Salmonella typhimurium*, auxotróficas para histidina apresentando mutações preexistentes no *operon* deste aminoácido, são incapazes de crescer em meio sem histidina, a menos que ocorram mutações reversas e a capacidade de sintetizar o aminoácido seja restaurada. Sendo a resposta do ensaio avaliada em número de colônias revertentes por concentração testada. Diversas linhagens foram projetadas para detectar uma ampla variedade de compostos. A linhagem TA98, que mede erro no quadro de leitura do DNA, foi utilizada como diagnóstico inicial. Essa linhagem abrange uma variedade de compostos, sendo o evento mutagênico de erro no quadro de leitura o mais

sensível nos estudos com amostras de ar (Ducatti & Vargas, 2003; Claxton et al., 2004). Os extratos orgânicos das amostras de água de abastecimento também foram avaliados com a linhagem TA100 que marca substituição de pares de base do DNA. A presença de nitroderivados foi avaliada nos extratos de PM_{2,5} utilizando linhagens da família das YGs. A linhagem YG1021 apresenta o plasmídeo (pYG216) onde está inserido o gene da nitroreductase clássica, enquanto que a YG1024, o plasmídeo (pYG219) que apresenta o gene da *O*-acetiltransferase. Essas linhagens com alta atividade enzimática apresentam, conseqüentemente, uma maior sensibilidade para nitrocompostos, como nitroarenos (pYG216) ou aminas aromáticas (pYG219), do que as parentais (Watanabe et al., 1989; Watanabe et al., 1990). Ainda foi avaliada a atividade de metabólitos em ensaios em presença de sistema de metabolização P450 de mamíferos *in vitro* (fração S9-homogenato de células de fígado de rato *Sprague-Dawley*, pré-tratado com AROCLOR1254, adquirida da Molttox - Molecular Toxicology, Inc).

A curva dose-resposta obtida nos ensaios foi avaliada por análise de regressão utilizando do programa SALANAL, onde um valor de colônias revertentes por unidade de amostra pode ser estimado, representando uma medida quantitativa e comparável de atividade mutagênica. A amostra é considerada positiva quando é observada curva dose-resposta reproduzível e ANOVA significantes ($p < 0,05$).

1.2.6 Análises químicas associadas

A análise dos compostos orgânicos dos compartimentos ambientais estudados foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os 16 HPAs classificadas como poluentes prioritários (USEPA) investigados foram: Acenafteno, Acenaftleno, Antraceno, Benzo(a)antraceno, Benzo(a)pireno, Benzo(b)fluorantreno, Benzo(g,h,i)perileno, Indeno(1,2,3-cd)pireno,

Benzo(k)fluorantreno, Criseno, Dibenzo(a,h)antraceno, Fenantreno, Fluorantreno, Fluoreno, Naftaleno e Pireno.

As amostras avaliadas quanto a presença de metais pesadas foram previamente digeridas de acordo com o Método 3050B USEPA SW846 (USEPA, 1995) e após analisadas por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP / MS) para a quantificação.

1.3 Biomarcadores genéticos na população

A avaliação de biomarcadores genéticos na população humana foi conduzida em famílias que habitam a localidade estudada. Foram priorizadas crianças de 5 a 12 anos. O grupo controle foi constituído de crianças entre as famílias habitantes em áreas fora do local de maior influência e escolhidas tendo por base os estudos de dispersão atmosférica regional e escoamento do lençol freático. O projeto, bem como o termo de consentimento e o questionário (Apêndice A), foi enviado ao Comitê de Ética do Hospital de Clínicas e aprovado como um adendo ao processo já existente - Projeto N^o 07-042: *Estratégias ecotoxicológicas para caracterizar áreas contaminadas como medida de risco à saúde de populacional* (Apêndice B).

Como marcadores genéticos foram utilizados os testes do cometa e o do micronúcleo em sangue periférico e em células da mucosa oral o teste do micronúcleo. Esses ensaios apresentam ampla aplicabilidade em monitoramento de populações humanas (Singh et al., 1988; Speit & Hartmann, 1999; Kassie et al., 2000).

1.3.1 Amostragem e coleta de material

De cada criança voluntária a participar da pesquisa foi realizada coleta de sangue, cerca de 4 mL, por meio de punção intravenosa com agulhas e seringas

descartáveis estéreis. Após a coleta, a amostra foi imediatamente transferida para tubos estéreis contendo solução anticoagulante (heparina). No mesmo momento foram coletadas amostra de células da mucosa oral, com escova de polietileno, as quais foram transferidas para solução salina fisiológica (0,9%). Os frascos com as amostras foram rotulados e conduzidos para o laboratório, mantidos a 4°C e ao abrigo de luz até o momento do processamento.

1.3.2 Teste do Micronúcleo em Mucosa Oral

As células da mucosa oral, amostradas e acondicionadas em solução salina fisiológica (0,9%) foram centrifugadas por três vezes e fixadas com solução de metanol e ácido acético (3:1). Na coloração das células foi empregado o método de *Feulgen/fast green*. As lâminas preparadas, estando em boas condições, foram analisadas em microscópio com objetiva de alta resolução (1000x) para a contagem das células conforme método e descrição apresentada por Thomas et al. (2009). Foram analisadas 1000 células para a avaliação da frequência de brotos nucleares (indicativo de amplificação de gene), células binucleadas (causada por falhas na citocinese) e várias formas de morte celular como cromatina condensada, cariorréxe, picnose e cariólise, representadas nas figuras 4 e 5 (Thomas et al., 2009). A frequência de biomarcadores de dano ao DNA, brotos e micronúcleos, foi avaliada em 2000 células diferenciadas. O mecanismo que leva à formação de brotos nucleares não é conhecido, mas pode estar relacionado com a eliminação do DNA amplificado ou reparo (Thomas et al., 2009). Para a definição de um micronúcleo foi utilizado o critério de Tolbert et al. (1992).

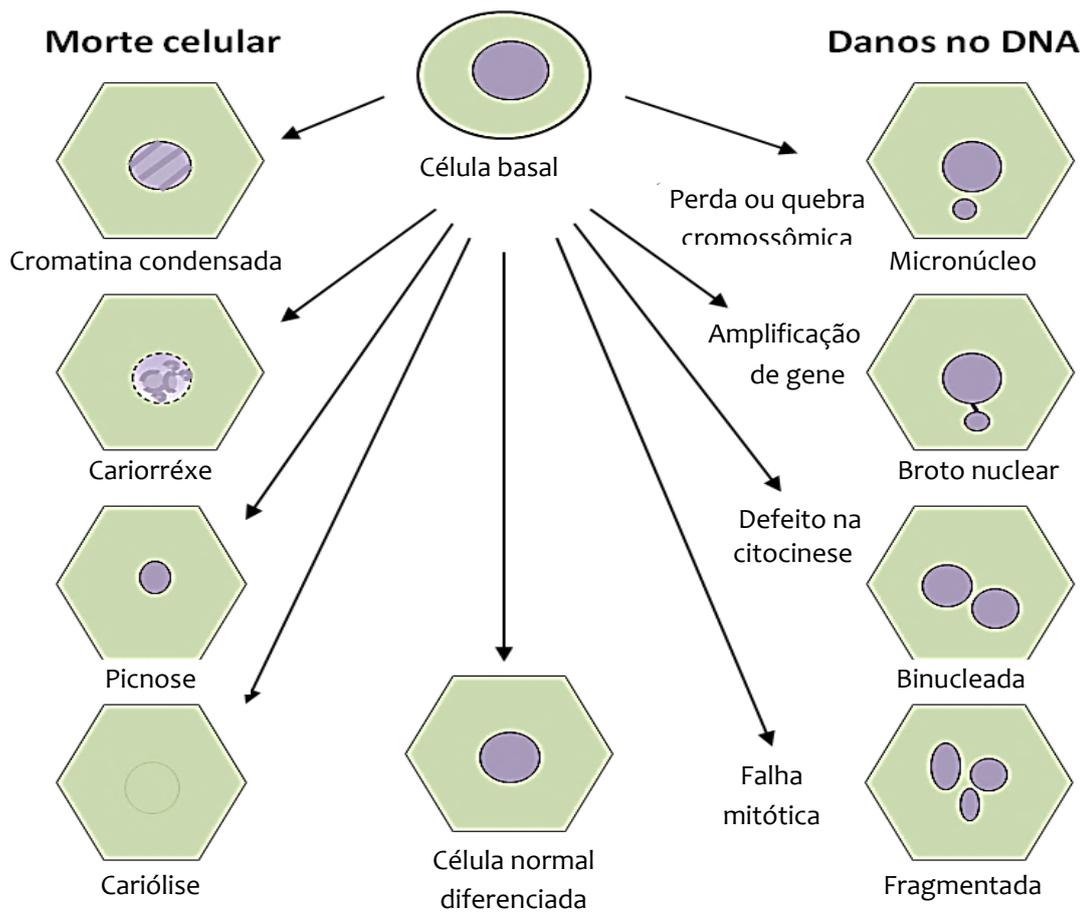


Figura 4 Representação dos tipos celulares avaliados no ensaio de micronúcleo. A partir de Holland et al. (2008) e Thomas et al. (2009).

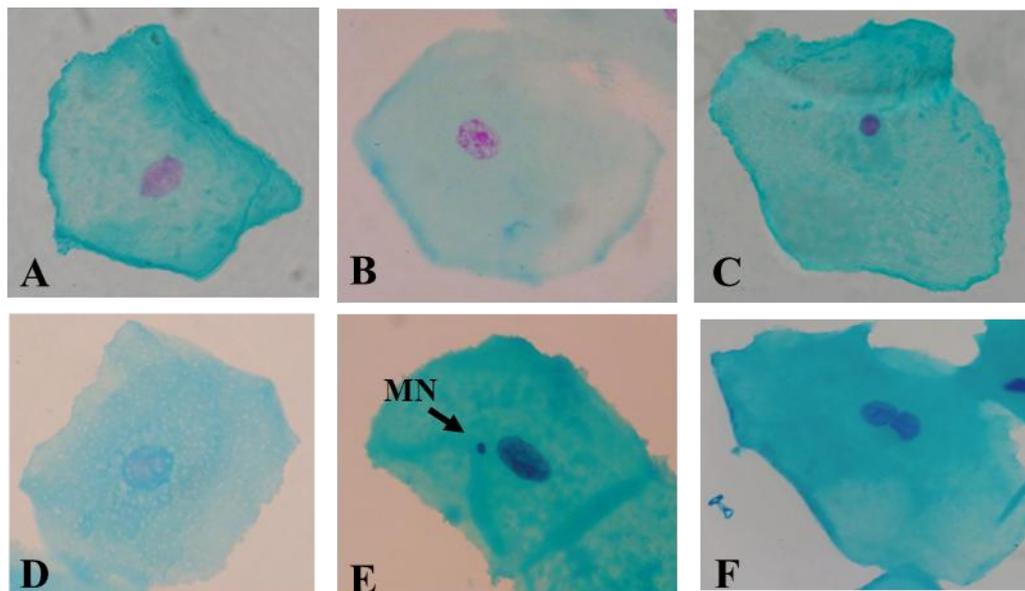


Figura 5 Imagens de células da mucosa oral com danos e alterações nucleares dos indivíduos analisados: (A) normal diferenciada, (B) cariorréxe, (C) picnose, (D) cariólise, (E) célula com micronúcleo e (F) célula binucleada.

1.3.3 Teste do Micronúcleo em Sangue Periférico

A partir das amostras de sangue coletadas foi realizada a cultura de linfócitos isolados conforme descrito em Fenech (2000) e Salvadori et al. (2003). As lâminas preparadas foram coradas e analisadas em microscopia óptica de luz em aumento de 400 vezes. Em cada lâmina analisada 1000 células foram contadas em teste cego (com membrana e núcleo intactos), totalizando 2000 células avaliadas por indivíduo.

1.3.4 Ensaio do Cometa

Com os linfócitos, isolados a partir da amostra de sangue, foi realizado o ensaio do cometa na versão alcalina permitindo que danos no DNA, provenientes de vários processos biológicos, como quebras de cadeia simples ou lesões a sítios álcali-lábeis ou ainda reparo incompleto dos sítios de excisão, fossem evidenciados (Speit & Hartmann,

1999). Os linfócitos foram isolados por centrifugação sobre gradiente de densidade de Ficol, sendo parte dessa fração corada (*Trypan Blue*) e analisada em microscópio com o objetivo de testar a viabilidade celular.

Os linfócitos, misturados com agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37°C, foram aplicados em lâmina previamente gelatinizada com agarose, de ponto de fusão normal (1,5%), cobertos por lamínula permanecendo em geladeira por 10 minutos. Depois de retirada a lamínula, a lâmina era colocada em solução de lise (2,5M NaCl; 100mM EDTA; 10mM Tris; 1% N-Lauroyl-Sarcosinato; 1% TritonX-100, dimetilsulfóxido - DMSO), pelo período de uma noite. Após esse período as lâminas eram transferidas para cuba horizontal de eletroforese e imersas em solução alcalina (10N NaOH; 200mM EDTA; pH>13) à 4°C. Após 20 minutos (tempo de desenrolamento das fitas de DNA) uma voltagem de 25V (300mA) era aplicada por 20 minutos. Durante esse processo os fragmentos de DNA se movem mais rápido do que moléculas intactas, resultando na formação de “um cometa com cauda”. O tamanho e quantidade de DNA na cauda irá indicar a quantidade de quebras das fitas de DNA presentes em determinada célula. Após a eletroforese, as lâminas eram retiradas da cuba e lavadas com solução de neutralização (0,4M Tris-HCl; pH 7,5) por três vezes e fixadas em etanol absoluto. Após secas, foram estocadas sob refrigeração até o momento da análise.

Para a análise, as lâminas eram coradas com brometo de etídio e analisadas em microscópio de fluorescência acoplado ao programa computacional específico *Comet Assay IV*, *Perceptive Instruments* (Suffolk, UK), que permite avaliar parâmetros como o tamanho e a intensidade da cauda (*tail intensity*), entre outros (Figura 6). Foram avaliados 50 nucleóides por lâminas e duas lâminas de cada voluntário.

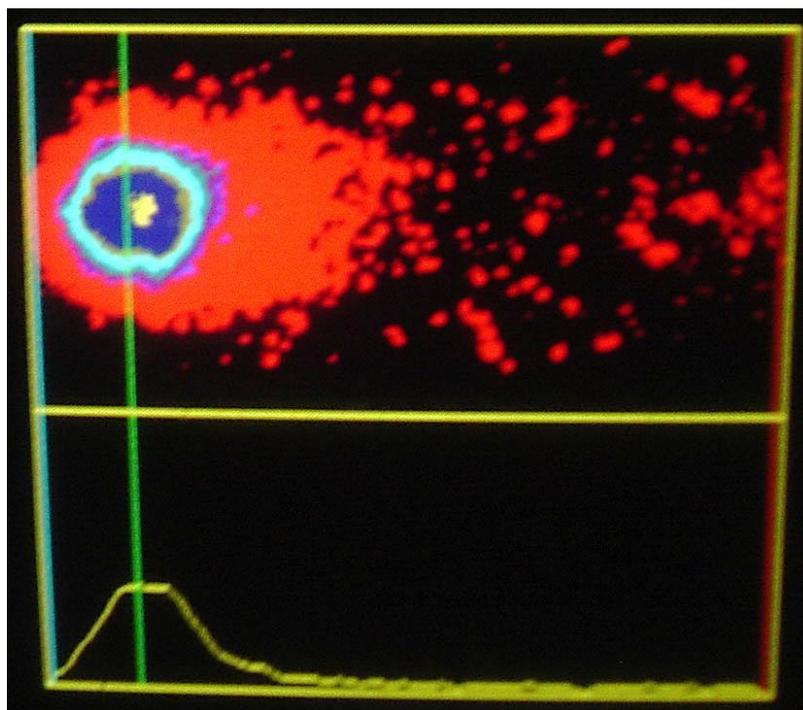


Figura 6 Análise da estimativa de danos por imagem utilizando microscopia de fluorescência integrada ao programa computacional *Comet Assay IV*.

1.4 Estruturação da tese

A presente Tese de Doutorado está estruturada em capítulos correspondentes aos artigos científicos resultantes do projeto desenvolvido.

O primeiro artigo “*Attic dust assessment near a wood treatment plant: past air pollution and potential exposure*” (submetido para publicação na *Archives of*

Environmental Contamination and Toxicology) apresenta os resultados obtidos pelas análises de amostras de poeira dos sótãos de residências no entorno dessa área contaminada. Nessas amostras foram quantificados os 16 HPAs prioritários e metais pesados (cromo, cobre e arsênio), além de pentaclorofenol. Foi avaliada a atividade mutagênica na presença e ausência de sistema de metabolização hepática de mamífero *in vitro* frente à linhagem TA98. A poeira acumulada no sótão das residências fornece medida indireta e histórica da poluição atmosférica e do potencial de exposição dos moradores.

O segundo artigo “*Avaliação de área contaminada por atividades de tratamento de madeira: biomarcadores genéticos ambientais e na população humana*” (a ser submetido para *International Journal of Hygiene and Environmental Health*.) também apresenta os resultados nessa localidade influenciada pela contaminação de substâncias utilizadas pela usina de tratamento de madeira. Nesse artigo são apresentados os resultados a partir das amostras de partículas finas atmosféricas (PM_{2,5}) e água destinada ao abastecimento público. Também são apresentados e discutidos os resultados dos biomarcadores genéticos avaliados nas crianças residentes nessa área.

2. Attic dust assessment near a wood treatment plant: past air pollution and potential exposure *

*Artigo submetido para publicação na *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* Co-autoras: Jovana Bavaresco, Jocelita Aparecida Vaz Rocha, Ana Maria Geller, Elina Bastos Caramão, Maria Lúcia Kolowski Rodrigues & Vera Maria Ferrão Vargas

Attic dust assessment near a wood treatment plant: past air pollution and potential exposure

Mariana Vieira Coronas^{a, b, c}, Jovana Bavaresco^d, Jocelita Aparecida Vaz Rocha^b, Ana Maria Geller^{e, 1}, Elina Bastos Caramão^e, Maria Lúcia Kolowski Rodrigues^{b,d}, Vera Maria Ferrão Vargas^{*a, b, c}

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

^b Programa de Pesquisas Ambientais, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM), Rua Doutor Salvador França, 1707, 90690-000, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: ecorisco@fepam.rs.gov.br Phone/Fax: +55 51 33344583

^c INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Rio de Janeiro, Brazil

^d Divisão de Química, FEPAM, Rua Aurélio Porto, 37, 90620-090, Porto Alegre, RS, Brazil.

^e Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

*To whom correspondence may be addressed:

Vera Maria Ferrão Vargas

Tel/Fax: + 55-51-33346765

e-mail: ecorisco@fepam.rs.gov.br

Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM)

Avenida Salvador França, 1707 CEP: 90690-000.

Porto Alegre, RS, Brazil.

¹Present address: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-rio-grandense (IFSul) - Campus Camaquã, Ana Gonçalves da Silva, 901 - Camaquã – RS, Brazil

Abstract

The wood treatment process uses substances that generate hazardous compounds that may contaminate environmental compartments. In the present study, an area under influence of a deactivated wood treatment plant was investigated to evaluate past air pollution and to try to understand local air dispersion. Attic dust samples were collected from eight residences around the plant and from two residences outside this area, as reference samples. The presence of Copper, Chromium, Arsenic, Pentachlorophenol, 16 priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and mutagenic activity using *Salmonella*/microsome assay was evaluated. The residences close to the entrance to the plant were the most affected, according to metals analysis. The PCP concentration was 0.49 mg/kg and the total PAHs content ranged from 0.40 to 13.31 µg/g with greater dispersion. The highest mutagenesis values were 15,905 and 10,399 revertants/g of dust in the absence and presence of S9 mix (mammalian metabolic activation), respectively. Samples in which the total PAHs concentration was less than 2µg/g no mutagenic effects were observed, including the residences in the reference area. The contribution of PAHs to mutagenesis was 10%, indicating that other compounds may contribute to the mutagenic effect. These results suggest that the population was or is potentially exposed to substances with strong effects on health.

Key-words: Mutagenicity, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Salmonella*/microsome assay, Pentachlorophenol, Metals

1. Introduction

The wood treatment process uses substances that generate hazardous compounds that may contaminate soil, surface and groundwater and air. In the wood treatment processes the chemicals used contaminate the environmental compartment through vaporization, leakages and dripping which occur during the treatment and storage processes. The potential for environmental contamination and consequent exposure of organisms to these substances will depend on the preventive and control measures adopted. Over the years, the processes and substances used to treat wood changed because of the discovery of the toxicity of these chemicals. Coal tar creosote is a complex mixture that contains hundreds of compounds, among which aromatic hydrocarbons predominate, including Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) (Gallego et al. 2008). Creosote treated-wood also emits volatile organic compounds and PAHs after treatment in storage fields (Gallego et al. 2008). The International Agency for Research on Cancer (IARC) has determined that coal tar creosote is probably carcinogenic to humans (IARC 2010). Pentachlorophenol (PCP) is a pesticide primarily used as wood preservative. PCP has not shown strong mutagenic activity but has demonstrated a synergic effect on mutagenicity (Gichner et al. 1998), and it is classified as possibly carcinogenic to humans (IARC 2010). The sale and use of PCP and its salts for activities aimed at preserving wood have been forbidden in Brazil since 2007 (Brasil 2006). After the use of creosote and PCP, chromated copper arsenate (CCA) was also used to preserve wood. Studies showed that soils from wood treatment plant are contaminated by arsenic due to the use of CCA (Bhattacharya et al. 2002) and that CCA treated wood leaches As, Cu and Cr (Hingston et al. 2001, Moghaddam and Mulligan 2008) suggesting the risk of contamination of the water resources. Environmental liabilities and contamination related to wood preservation activities have been reported worldwide (da

Costa et al. 2012, Dahlgren et al. 2007, Feng et al. 2011, Hensley et al. 2007, Pohren et al. 2012).

In this context, not only occupational exposure, but also environmental exposure to the surrounding population may result in adverse health effects. Previous studies have showed adverse health effects, like mucous membrane irritation, skin, and neurological symptoms besides cancer on long-term residents near a wood treatment plant (Dahlgren et al. 2003a). Elevated levels of polychlorinated dioxins and furans in blood samples from nearby residents of wood treatment facilities were observed around United States of America (Dahlgren et al. 2003b, Dahlgren et al. 2007, Feng et al. 2011, Hensley et al. 2007, Karouna-Renier et al. 2007). PCDD/F congener profiles in individuals that worked and lived in the surrounding neighborhoods of Escambia Treating Company reflected patterns commonly observed in persons exposed to PCP, also hypertension was correlated with PCDD/F levels (Karouna-Renier et al. 2007). These previously mentioned studies also identified specific contamination from the activities of the wood treatment plant in sediment, soil, house dust (Dahlgren et al. 2003b) and attic dust samples (Dahlgren et al. 2007, Hensley et al. 2007).

Particles present in the outside environment are important sources of indoor air quality (Maertens et al. 2004, Mercier et al. 2011). The influence from outdoors in the composition of house dust has been demonstrated (Caravanos et al. 2006, Davis and Gulson 2005, Gozalez et al. 2011, Lamberte and Lane 2004). Also, house dust seems to be a sensitive matrix to indicate heavy metals (Callan et al. 2012) and PAHs (Gevao et al. 2007) environmental contamination. The particles from the outside environment infiltrate the attics and indoors these contaminants accumulate and are preserved, since they are less subject to environmental degradation (such as sunlight, temperature changes and decomposition by microbial influence). Due to these properties and

complexity, attic dust can be an interesting matrix that can provide an indirect measure of air pollution integrated over varying time periods, and thereafter resident's potential for present and past exposure (Davis and Gulson 2005, Gozalez et al. 2011).

Recently, studies have attempted to determine the substances, their sources and pathways to estimate the effects of indoor exposure on health (Mercier et al. 2011, WHO 2010). The World Health Organization (WHO) published a guideline for some selected pollutants in indoors environment, however these values are expressed as m^3 of air. In the present study, the environmental matrix evaluated was attic dust, which besides supplying information on indoor contaminants, also tries to evaluate the outdoor sources of contamination. Due to the complexity of this matrix, and the absence of reference values, the results obtained in this study were compared to the USEPA Regional Screening Levels for Chemical Contaminants at Superfund Sites for resident soil (USEPA 2011) and to the guiding values for soil quality as to the presence of chemical substances established by the National Council of the Environment (Brasil 2009). This current work investigated the presence of hazardous contaminants and mutagenic activity associated with attic dust. The objective was to evaluate past air pollution and try to understand local air dispersion of contaminants.

2. Material and Methods

2.1 Study area

The study area is located on the left bank of Taquari river and 8.5 km south of the confluence with Jacuí river, in the northeast of the state of Rio Grande do Sul, Brazil (municipality of Triunfo) (Figure 1). The wood treatment plant is located on the left bank of the river Taquari, the area is flat with small streams flowing towards the main

river drainage. Local geology is characterized by sedimentary rocks, fine to very fine sandstones with intercalations of laminates (argilites and shales). In the surroundings of the plant there is a small residential neighborhood (with local shops and crops are cultivated for subsistence). On the right bank of the river, the predominant use is agricultural. The wood treatment plant operated from 1960 to 2005 and used a variety of processes and substances including creosote, pentachlorophenol (PCP) and chromated copper arsenate (CCA). Initial chemical analyses showed evidence of groundwater and soil contamination by PAHs, Cr, Cu, As, PCF, dioxins and furans (FEPAM 2010a,b).

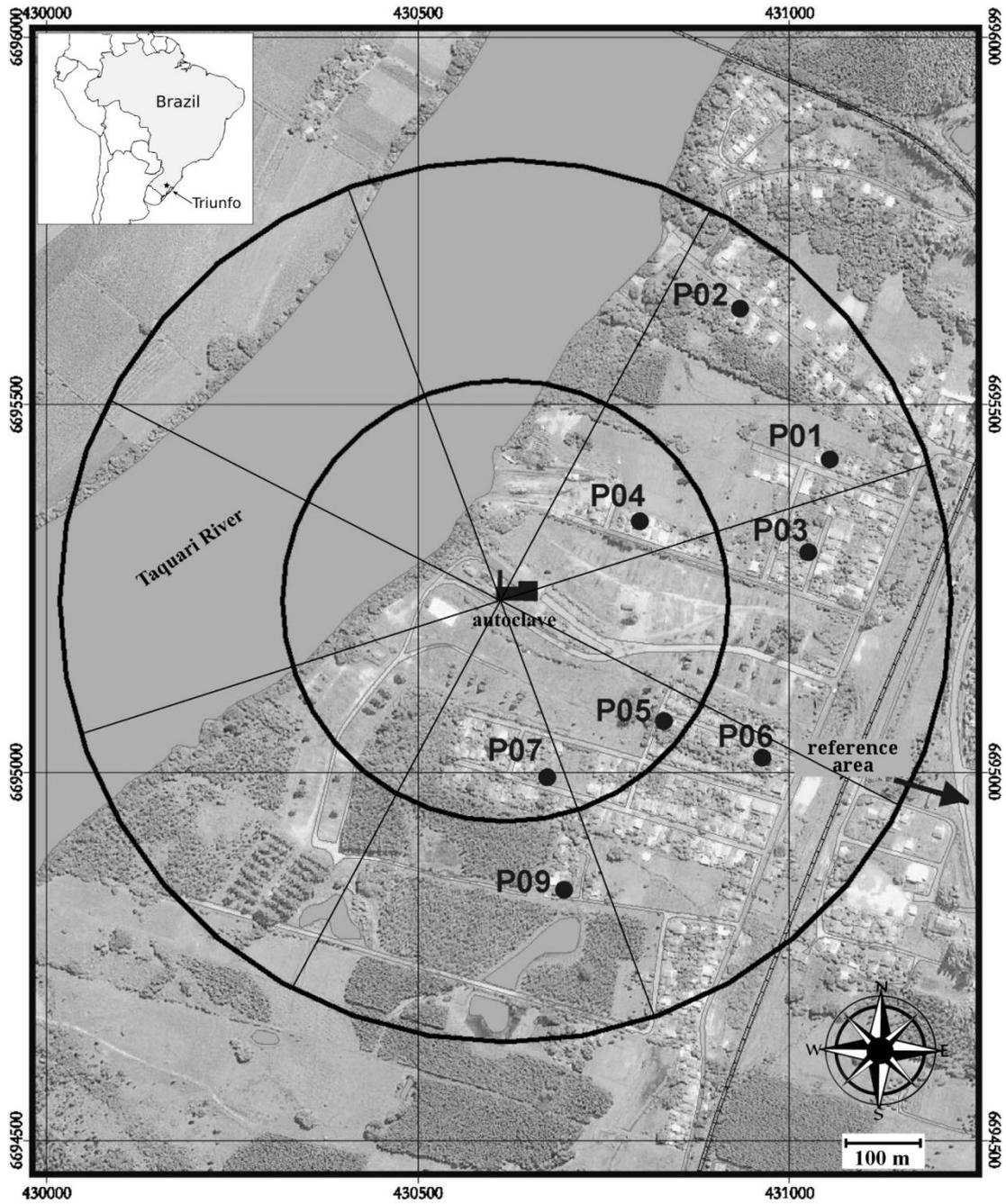


Figure 1 Location of the studied area and residences where attic dust samples were collected based on the location of the autoclave; the two concentric circles delimit 300 and 600 meter radiuses. Samples 10 and 11 (in the reference area, 1750 km eastern) do not appear in this map.

2.2 Attic dust sampling

Intending to identify a possible dispersion gradient for the contaminants of interest, the surrounding region was considered the one at risk from the influence of the plant activities. The unavailability of local data referring to the micro-climate encouraged the adoption of this approach, since the dominant regional wind direction is southeast (24.9 %), which would preferentially transport the pollutants into the Taquari River and into areas that are not heavily settled. On the other hand, the second preferential wind direction, which is northwest (13.7 %), would influence the area around the plant (data measured by climatological station N° 83954 COPESUL/INMET). The residences were chosen by tracing two concentric circles with a radius of 300 and 600 meters, respectively, originating from the main building of the treatment plant (prioritizing the location of the autoclave). The division of the circle into sections delimited different zones which could be sampled, where the residences were chosen randomly for evaluation. Within the 300 m radius, houses 4, 5 and 7 were evaluated, and in the 600 m radius, residence 1 (only evaluated for metals, since there was not sufficient material to extract the organic compounds), 2, 3, 6 and 9 (Figure 1). There were no residences in southwestern sections that explain why there is no sample number 8. Two more houses, 1750 meters eastward from this area, were also sampled to be used as reference samples (residences numbers 10 and 11). Samples were collected in May and July 2008. Sampling was performed by carefully sweeping the dust accumulated in the attic using natural bristle brushes. Samples were brought refrigerated to laboratory where the impurities were carefully removed and then were weighed and stored in prewashed glass containers protected from light and refrigerated until the preparation for extraction and chemical analysis. The house characteristics like age, roof type, presence of wood burning stove and others were documented (Table 1).

In a second stage (October 2010) a composite sampling was performed of six nearby residences (the same street as samples 5 and 6) to evaluate the presence of PCP. This sampling followed the same methods mentioned previously. PCP quantification in the composite sample was performed by gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS), with previous extraction by methylene chlorides.

Table 1 Characteristics of the residences in which attic dust samples were collected in the area under the influence of the wood preservation plant

Residence	House age (in years)	Presence of wood burning stove	Roof	Smokers
1	10	yes	fiber-cement tile	no
2	40	no	clay tile	yes
3	more than 40	yes	fiber-cement tile	no
4	NI	yes	fiber-cement tile	no
5	more than 40	NI	fiber-cement tile	NI
6	more than 40	yes	fiber-cement tile	yes
7	10	no	clay tile	no
9	40	yes	fiber-cement tile	yes
10	40	no	fiber-cement tile	yes
11	26	yes	fiber-cement tile	no

NI – not informed

In a second stage (October 2010) a composite sampling was performed of six near by residences (the same street as samples 5 and 6) to evaluate the presence of PCP. This sampling followed the same methods mentioned previously. PCP quantification in the composite sample was performed by gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS), with previous extraction by methylene chlorides.

2.3 Metals

The samples were digested for arsenic, copper and chromium analysis according to the USEPA SW846 Method 3050B (USEPA 1995); inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP / MS) was used for quantification.

2.4 Organic extraction

The attic dust samples were extracted by sonication (THORNTON - power 1800 W) using dichloromethane (DCM, CASRN. 75-09-2) at a ratio of 1(dust):2(solvent). After filtration with a Millipore membrane, 0.5 µm porosity, the volume was concentrated in a rotary evaporator at 40°C to obtain the final extract. The extract was stored in a graduated tube, from which a 1 mL aliquot was removed to determine the extracted organic matter (EOM). The final extract was analyzed to the PAHS concentration and to mutagenic activity.

2.5 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

The attic dust organic extracts from the seven houses under the area of influence of the wood treatment plant and the two from the reference area were analysed for 16 priority PAHs including naphthalene (Naph), acenaphthylene (Acy), acenaphthene (Ace), fluorine (Fln), phenanthrene (Phe), anthracene (Ant), fluoranthene (Flt), pyrene (Pyr), benzo[a]anthracene (B[a]A), chrysene (Chr), benzo[b]fluoranthene (B[b]F), benzo[k]fluoranthene (B[k]F), benzo[a]pyrene (B[a]P), indeno[1,2,3-c,d]pyrene (I[cd]P), dibenzo[ah]anthracene (DB[ah]A) and benzo[ghi]perylene (B[ghi]P) in dichloromethane. PAHs were quantified by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) performed on a Shimadzu QP-2010 using electron-impact (EI) ionization (70 eV). The capillary column used was a DB-5 (30 m × 0.25mm i.d. × 0.25 µm film thickness) (J&W Scientific, Folsom, CA, USA). The injector temperature was 280 °C

and the interface was 300 °C. The initial GC temperature was 60 °C then ramped 10 °C min⁻¹ to 290 °C for 3 min and then heated to 300 °C at 3 °C min⁻¹ for 4 min. One microliter volumes were injected in splitless mode. The MS was operated in single-ion monitoring mode (SIM mode), The time interval and the monitored ions are given in Table 2. Prior to analyses biphenyl (Internal Standard—IS) was added to a 200 ppb concentration. Calibration standards consisting of solutions containing the 16 PAHs (100 ppb and 5 ppb) were run at the same conditions as the samples to check the performance of the chromatographic method and to quantify the PAHs.

Table 2 Time interval and monitored ions of the SIM method.

Initial time (min)	End time (min)	Ions monitored
5:00	9:00	128
9:00	13:50	152, 154, 166
13:50	18:20	178, 202,
18:20	22:30	202, 228
22:30	33:00	252, 276, 278

2.6 *Salmonella* mutagenicity test

The attic dust organic extracts were assayed for mutagenicity using the *Salmonella*/microsome assay (Maron and Ames 1983) in the microsuspension method (Kado et al. 1986). For each sample, *Salmonella typhimurium* TA98 (frameshift strain) was used with and without mammalian metabolic activation (S9 mix fraction). Six twofold concentrations of each sample (1.25 to 40 µg of extracted organic matter per

plate) were tested in duplicate. Prior to bioassay performance, the organic extract was reduced to dryness with gaseous nitrogen and resuspended in 5µl of dimethyl sulfoxide (DMSO, CASRN. 67-68-5 from Riedel-De Haen). All assays were carried out under yellow light and in the presence of negative (DMSO solvent, 5µl/plate) and positive (4-nitroquinoline oxide—4NQO, 0.5µg/plate, CASRN. 56-57-5 and 2-aminofluorene—2AF, 1µg/plate, CASRN. 153-78-6 from Sigma Chemical Company, St.Louis, MO) controls. The positive responses were expressed as the number of revertants per gram of attic dust (rev/g) by the calculation of linear regressions from the dose–response curves. The significance of ANOVA ($p \leq 0.05$) and linear regressions from the dose–response curves ($p \leq 0.05$) was evaluated by SALANAL software (*Salmonella* Assay Analysis, version 1.0, Integrated Laboratory Systems of Research Triangle Institute, RTP, North Caroline, USA) choosing the linear or Bernstein model (Bernstein et al. 1982). Pearson correlations were used to investigate the relationship between mutagenic activity and PAHs concentration.

3. Results and discussion

3.1 Pentachlorophenol

The analysis of pentachlorophenol performed on the composite sample resulted in a PCP concentration of 0.49 mg/kg (result expressed as dry base). This concentration is three times higher than the limit of prevention for soils established in Brazilian law that is 0.16 mg/kg (Brasil 2009), but below the USEPA Regional Screening Level for residential soils, which is 0.89 mg/kg (USEPA 2011).

PCP can be absorbed by inhalation, ingestion or through the skin (ATSDR 2001, Seiler, 1991) and, since it is a nonpolar, lipophilic substance, it can easily penetrate the membranes and be absorbed by the lungs, gastrointestinal tract and skin (ATSDR

2001). The acute and chronic exposure to PCP may result in effects on blood and liver, and eye irritation (ATSDR 2001). Also, exposure to PCP may be associated with cancer, since the evidence of its carcinogenic and genotoxic potential in human and animal tests suggests that it may be a human carcinogen (ATSDR 2001).

3.2 Metals

The results for metals evaluated in the eight surrounding residences and in the two that lie farther away (10 and 11) are shown in Table 3. The residences closest to the entrance to the plant (samples 6, 5 and 3) were most affected by deposition of dust contaminated especially with arsenic and chromium. Residence 10, in the reference area, showed the highest copper concentration and an elevated chromium concentration. The high concentrations of these metals can be due another source besides the emissions of the plant since these elements are present in various products and materials used in the residences. Copper, for example, is commonly present in electrical wires and plumbing.

Table 3 Heavy metals detected in attic dust samples (mg/kg) (continue)

Residence	Arsenic	Chromium	Copper
1	6,1	19,3	29,7
2	5,6	14,6	37,8
3	20,8	35,0	42,0
4	11,0	26,7	54,1
5	15,5	39,0	39,4
6	16,5	48,7	43,0

Table 3 Heavy metals detected in attic dust samples (mg/kg) (conclusion)

Residence	Arsenic	Chromium	Copper
7	8,2	15,4	44,2
9	12,3	18,1	49,6
10	5,2	34,3	82,4
11	3,4	14,3	30,0

The values obtained for arsenic are 8 to 53 times higher than the standard established for residential soils (0.39 mg/kg) by USEPA, based on the possibility of risks to human health (USEPA 2011). This guiding value is not a limit to be used during the phases of investigation or recovery of contaminated areas. It should be used to identify sites that may require future investigation, because of a potential risk to human recipients. The guiding values for chemical substances according to Brazilian law are 15 and 55 mg/kg, for prevention values and for residential soils, respectively (Brasil 2009). According to this standard, only three samples were higher than the prevention values for arsenic. The concentrations of the other metals evaluated are below the values established in these standards in almost all samples. USEPA does not establish a guiding value for total chromium. For copper, only sample 10 is higher than the prevention value established in Brazilian law, 60 mg/kg (Brasil 2009). The mean concentrations of these metals in attic dust samples, in a community living around a former wood treatment facility, evaluated by Hensley et al. (2007), were similar to those found in the present study, except for arsenic, which presented a very high concentration in one of the residences sampled (261 mg/kg).

Arsenic causes acute and chronic adverse health effects, affecting skin, cardiovascular, hepatic, endocrine and other systems and organs (Hughes 2002). Also, arsenic is a human carcinogen and chronic exposure is associated with cancer (Bhattacharjee et al. 2013; Rossman 2003). The genotoxic effect of arsenic can be observed in low dose experiments (Rossman 2003). Arsenic and its metabolites generate oxidative stress, which in turn likely leads to genomic instability through several mechanisms including DNA damage, inefficient DNA repair, telomere dysfunction, mitotic arrest and apoptosis (Bhattacharjee et al. 2013). The arsenic concentrations found in the attic dust samples suggest that the residents of the surroundings of the wood treatment plant were exposed to inappropriate levels of this pollutant, which could lead to adverse effects.

Arsenic is a contaminant of major concern at this area not only for its toxicity but also because it is a good marker of the emissions of the plant since the environmental background values of this element is low in the region. Furthermore, arsenic is not commonly used in construction materials and in indoors supplies unlike copper and chromium. Therefore arsenic concentration in the attic dust indicated that the residences closer the plant were more affected by its emissions.

3.3 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Eight of these 16 PAHs analyzed are classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC 2010) as group 1 (carcinogenic to humans: benzo[a]pyrene), group 2A (probably carcinogenic to humans: dibenzo[ah]anthracene) or group 2B (possibly carcinogenic to humans: naphthalene, benzo[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, indeno[1,2,3-cd]pyrene). In the present study, these eight PAHs were expressed in the results as carcinogenic and acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene,

pyrene, and benzo[ghi]perylene were expressed as other PAHs. The sum of carcinogenic and other PAHs concentrations are shown in figure 2. The sample 1 The total PAH content ranged from 0.40 to 13.31 $\mu\text{g/g}$. The carcinogenic PAHs represented 16 to 56% of the total PAHs concentration in the residences from the risk area samples. Phenanthrene and pyrene showed higher concentrations than the other PAHs.

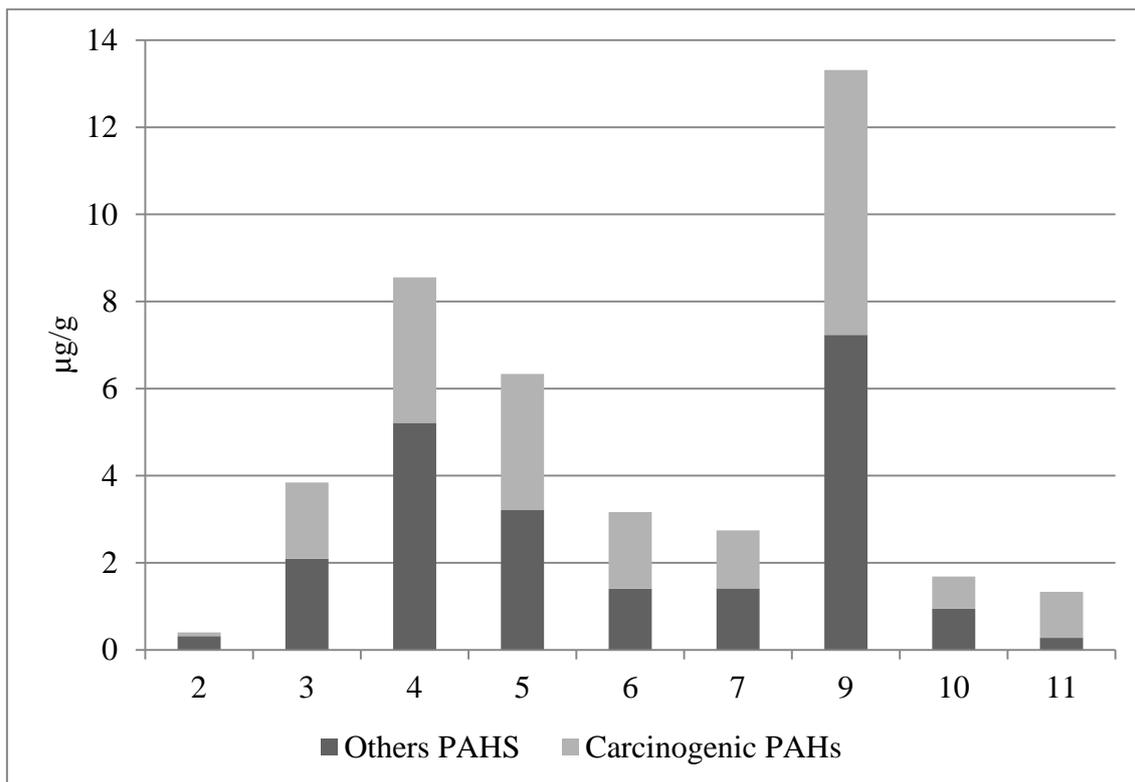


Figure 2 Sum of the 16 PAHs measured in attic dust samples. Carcinogenic PAHs are Naph, B[a]A, Chr, B[b]F, B[k]F, B[a]P, I[cd]P and DB[ah]A, classified as group 1, 2A or 2B by IARC. Acy, Ace, Fln, Phe, Ant, Flt Pyr and B[ghi]P are other PAHs.

Sample 1 was not evaluated because there was not sufficient material to extract the organic compounds

The total PAHs concentration in dust samples can be very variable due to the outdoors and indoors sources of the compounds and residence characteristics, like age (Kang et al. 2011, Maertens et al. 2004). A review of settled house dust found values between 0.4

and 544 $\mu\text{g/g}$ of total PAHs (Maertens et al. 2004). The presence of smokers (Hoh et al. 2012) and the location of the house in urban areas (Maertens et al. 2004) increases the total PAH content, although the two-way analyses of variance revealed significant but low values, indicating that the effects of these factors were weak (Maertens et al. 2004) or not observed (Maertens et al. 2008a). Other studies reported total PAHs values found in house dust varying from 0.036 to 34.45 $\mu\text{g/g}$ (Mannino and Orecchio et al. 2008) and 1.63 to 29.2 $\mu\text{g/g}$ (Kang et al. 2011). The matrix evaluated in this study, attic dust, is different from settled house dust, since the former is the result of a longer period of accumulation of contaminants, mainly from outdoors, while the latter is a more recent accumulation, due to the greater frequency of cleaning the dust accumulated on the floor or on the furniture, compared to the frequency of cleaning the attic. Besides, settled house dust is more influenced by indoor activities and substances. Despite the differences, the results of the PAHs content in this study were within the range of other studies. Indeed, a few residences presented concentrations similar to these studies when they sampled house dust from a place where there was strong urban influence, including heavy traffic, different from the context of the site of this study.

Of the 16 PAHs analyzed, 10 presented prevention values according to Brazilian law and all, except phenanthrene, surpassed the values in at least one of the samples. Benzo[a]anthracene surpassed the reference value in most of the samples (Table 4).

Table 4 Values of the 16 PHS measured in the attic dust samples collected in an area under the influence of a wood preservative plant compared to USEPA Regional Screening Levels for Chemical Contaminants at Superfund Sites and Brazilian National Council of the Environment values for soil (mg/kg) (continue).

	Samples										USEPA	Brazil	
	2	3	4	5	6	7	9	10	11	Resident soil ^a	Resident soil ^b	Prevention value ^{b,c}	
Naphthalene	0.01	0.02	0.01	0.21	0.04	0.12	0.12	0.04	0.06	3.6	60	0.12	
Acenaphthylene	0.01	0.05	0.05	0.04	0.07	0.05	0.16	0.00	0.00	ND	ND	ND	
Acenaphthene	0.02	0.10	0.05	0.06	0.06	0.03	0.05	0.00	0.00	3400	ND	ND	
Fluorene	0.02	0.08	0.07	0.07	0.04	0.04	0.17	0.02	0.00	2300	ND	ND	
Phenanthrene	0.18	1.35	1.00	0.87	0.88	0.48	2.60	0.22	0.25	ND	40	3.3	
Anthracene	0.02	0.11	0.05	0.07	0.14	0.06	0.17	0.02	0.02	17000	ND	0.039	

Table 4 Values of the 16 PHS measured in the attic dust samples collected in an area under the influence of a wood preservative plant compared to USEPA Regional Screening Levels for Chemical Contaminants at Superfund Sites and Brazilian National Council of the Environment values for soil (mg/kg) (continuing).

	Samples										USEPA	Brazil	
	2	3	4	5	6	7	9	10	11	Resident soil ^a	Resident soil ^b	Prevention value ^{b,c}	
Fluoranthene	0.00	0.00	2.10	0.52	0.00	0.00	0.00	0.32	0.00	2300	ND	ND	
Pyrene	0.00	0.00	1.36	0.30	0.00	0.60	3.25	0.25	0.00	1700	ND	ND	
Benzo[a]anthracene	0.07	0.33	0.30	0.01	0.27	0.12	0.86	0.08	0.03	0.15	20	0.025	
Chrysene	0.00	0.87	0.72	0.03	0.45	0.37	1.57	0.18	0.11	15	ND	8.1	
Benzo[b]fluoranthene	0.00	0.00	0.76	0.03	0.33	0.28	1.19	0.10	0.34	0.15	ND	ND	
Benzo[k]flouranthene	0.00	0.00	0.53	0.02	0.25	0.20	0.98	0.12	0.42	1.5	ND	0.38	

Table 4 Values of the 16 PHS measured in the attic dust samples collected in an area under the influence of a wood preservative plant compared to USEPA Regional Screening Levels for Chemical Contaminants at Superfund Sites and Brazilian National Council of the Environment values for soil (mg/kg) (conclusion).

Benzo[a]pyrene	0.00	0.00	0.38	0.05	0.10	0.09	0.33	0.10	0.10	0.015	1.5	0.052
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	0.00	0.45	0.54	0.03	0.30	0.14	0.95	0.12	0.00	0.15	25	0.031
Dibenzo(ah)anthracene	0.00	0.09	0.09	0.00	0.03	0.02	0.10	0.01	0.00	0.015	0.6	0.08
Benzo[ghi]perylene	0.08	0.40	0.54	0.04	0.21	0.17	0.82	0.12	0.00	ND	ND	0.57

^a USEPA (2011); ^b BRASIL (2009); ^c Prevention Value is the concentration of the limit value of a given substance in soil, such that it can sustain its main functions Sample 1 was not evaluated because there was not sufficient material to extract the organic compounds

3.4 *Salmonella* mutagenicity test

Attic dust samples induced frameshift mutation in the TA98 strain in *Salmonella*/microsome assay in the presence and absence of metabolic activation, S9 mix (Figure 3). Besides the samples from the reference area, sample 2 from the risk area also presented an absence of mutagenicity. Samples 5 and 9 showed the highest mutagenicity values 15,905 and 10,399 revertants/g of dust in the absence and presence of S9 mix, respectively. The higher values of mutagenic activity are in the northwest wind quadrant (second wind direction). Reviewing the mutagenic effects of settled house dust, Maertens et al. (2004) found values varying from 1,000 to 7,000 revertants/g for TA98. Some residences evaluated in this study presented higher effects than those found by these authors, both in the presence and absence of the S9 mix fraction. More recent studies also found higher values for the mutagenic potential in samples of indoor house dust, reaching values higher than 6,000 and 32,000 (Kang et al. 2011), 14,000 and 43,000 (Maertens et al. 2008b) revertants/g for TA98 with and without S9 mix, respectively. Although most of the samples in this study presented higher responses in the assays in the presence of S9 mix, the highest mutagenicity value observed was without S9 mix (15,905 revertants/g, sample 5).

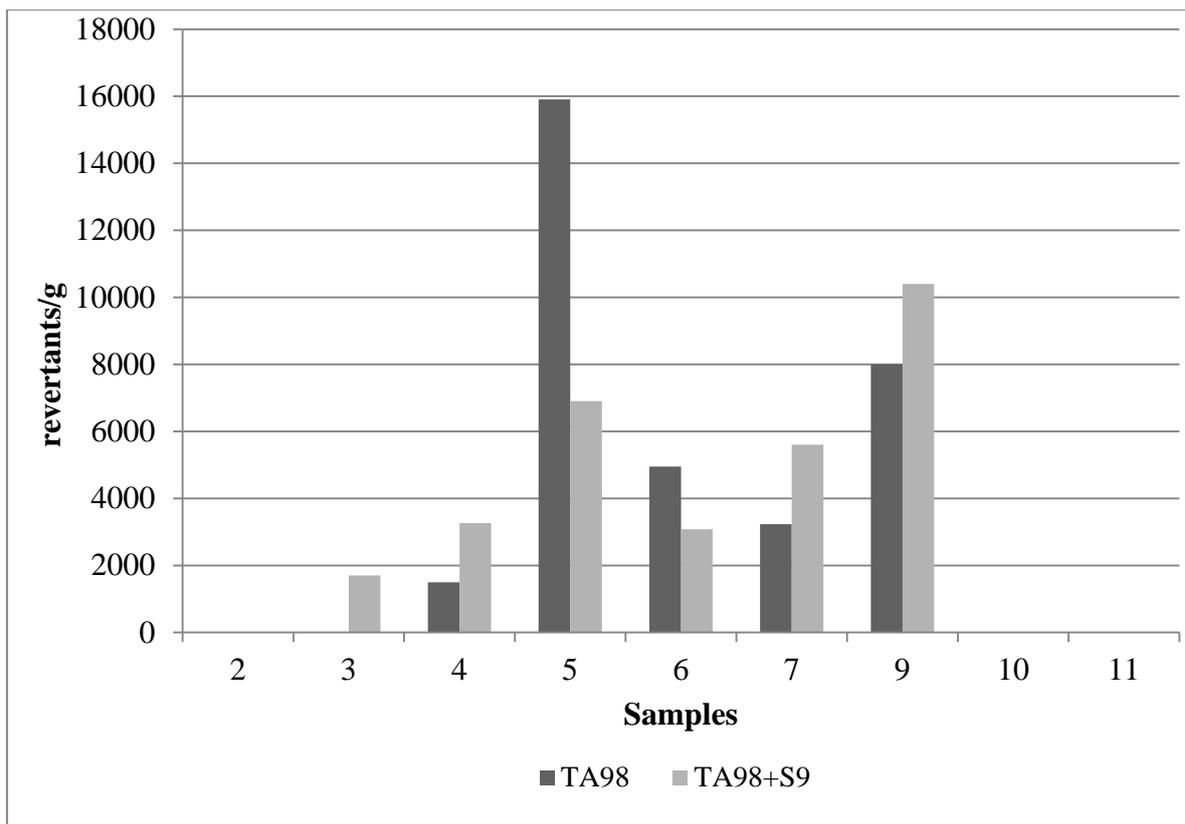


Figure 3 Mutagenic potency (revertants/g) for attic dust extracts in *Salmonella*/microsome assay for TA98 strain.

Sample 1 was not evaluated because there was not sufficient material to extract the organic compounds

The area of the present study is being broadly investigated for the presence of contaminants and mutagenic activity in the different environmental compartments. Compared to the other environmental matrices evaluated from organic extracts with DCM solvent (an extraction method similar to that of the present study) in the same area, attic dust reached much higher values than those found for soil, which were 107 and 1,285 revertants/g dry soil (Pohren et al. 2012) and river sediment which was 64 and 247 revertants/g dry sediment (da Costa et al. 2012), in the absence and presence of S9 mix, respectively for the mutagenic potential compared to strain TA98. This greater

mutagenic activity associated with attic dust may be related to matrix chemical composition and characteristics. Although soil and sediment are also compartments that can accumulate contaminants over time, there are a lot more inert geological materials in their composition than in attic dust. The same is observed to the great mutagenic potential for atmospheric particulate matter. Comparing the results with fine particulate matter (PM_{2.5}) sampled in the same exposed area (near residence number 7), it reaches much higher mutagenicity values for TA98 767,479.7 revertants/g of PM_{2.5} (6.9 rev/m³) and 445,133.7 revertants/g de PM_{2.5} (10.83 rev/m³) in the absence and presence of S9 mix, respectively (Coronas, in preparation). In this case the fine suspended particles present a higher concentration of organic substances with mutagenic effects per gram of particle than the attic dust which, besides being material of geological origin, also contains other inert materials like fur, residues of construction materials and others.

3.5 PAHS and Mutagenic Activity

A significant relationship ($r=0.717$, $p<0.05$) was observed between the total concentration of PAHs and activity of strain TA98 in the presence of S9 mix. Nine of the 16 analyzed PAHs are *Salmonella* mutagens (Maertens et al. 2008b). Using the same approach as Maertens et al. (2008b) of considering the additive effect of PAHs, an expected mutagenic potency value for each sample was calculated based on the predicted mutagenic values for each PAHs. These predicted mutagenesis results were compared to those observed in the assays (Table 5). Naphthalene, acenaphthene, fluorine, anthracene and indeno[1,2,3-cd]pyrene did not induce mutations in *Salmonella* TA98 in the presence of S9 mix and there is no data available for acenaphthylene mutagenicity (Maertens et al., 2004). The predicted mutagenesis value was lower than the response observed in most samples, indicating that the PAHs evaluated in this study

represented not more than 10% of the mutagenic activity observed for TA98 (+S9). These observations highlight the importance of biological assays in the evaluation of complex mixtures. In the samples in which the total PAHs concentration was less than 2µg/g no mutagenic effects were observed and the presence of PAHs with a mutagenic potential resulted in low predicted values. Although additive effects were considered for this mixture of PAHs, which would be a reasonable assumption (Maertens et al. 2008b), additional effects could also be expected due to the presence of other compounds and even synergic effects. Pentachlorophenol, for instance, present in attic dust samples from the area investigated, although not mutagenic, has a synergic effect on the mutagenicity of other substances (Gichner et al. 1998). As to the responses observed for the organic compounds (PAHs) and the mutagenic activity of these extracts, the evaluation indicates the residences located in the southwest quadrant in relation to the plant, subject mainly to the direction of northwest winds (second wind direction), as the most exposed.

Table 5 Predicted mutagenic potency for *Salmonella*/microsome assay for TA98 strain in presence of mammalian metabolic activation (S9 mix) based on the concentration and mutagenic potency of PAHs (continue)

PAH	TA98+S9 (revertants/ μg) ^a	Expected mutagenic activity (revertants/g)								
		2	3	4	5	6	7	9	10	11
Phenanthrene	1.38	0.25	1.86	1.38	1.20	1.22	0.66	3.59	0.30	0.35
Fluoranthene	17.60	0.00	0.00	36.91	9.10	0.00	0.00	0.00	5.58	0.00
Pyrene	8.32	0.00	0.00	11.31	2.53	0.00	5.00	27.06	2.10	0.00
Benzo(a)anthracene	56.00	4.09	18.31	16.74	0.61	15.06	6.83	47.94	4.20	1.57
Chrysene	0.52	0.00	0.45	0.37	0.02	0.23	0.19	0.81	0.09	0.06
Benzo(b)Fluranthene	61.00	0.00	0.00	46.48	1.96	20.01	17.02	72.65	6.04	20.98
Benzo(k)Fluranthene	59.00	0.00	0.00	31.33	0.93	14.63	11.62	57.64	6.96	24.66

Table 5 Predicted mutagenic potency for *Salmonella*/microsome assay for TA98 strain in presence of mammalian metabolic activation (S9 mix) based on the concentration and mutagenic potency of PAHs (conclusion)

PAH	TA98+S9 (revertants/ μg) ^a	Expected mutagenic activity (revertants/g)								
		2	3	4	5	6	7	9	10	11
Benzo(a)pyrene	488.00	0.00	0.00	186.90	23.63	49.78	44.90	160.06	46.36	46.85
Dibenzo(a,h)anthracene	39.00	0.00	3.35	3.47	0.19	1.21	0.70	3.71	0.47	0.00
Benzo(g,h,i)perylene	7.52	0.58	3.00	4.02	0,30	1.60	1.27	6.19	0.93	0.00
Total		4.92	26.97	338.92	40.47	103.74	88.19	379.65	73.04	94.47
Mutagenic activity observed (revertants/ μg)		0.00	1702.40	3265.66	6902.48	3080.49	5603.67	10399.48	0.00	0.00

^a Maertens et al. (2008b); Maertens et al (2004) Sample 1 was not evaluated because there was not sufficient material to extract the organic compounds

4. Conclusions

The analysis of attic dust samples around the wood treatment plant showed contamination by Pentachlorophenol, Arsenic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. These results suggest that the surrounding population was exposed to substances with potential adverse health effects, through air, besides a possible current exposure by direct contact with contaminated dust, or following any circulation of air between the house attics and the living areas. The particulate matter deposited in the attics probably came from the treatment processes and also due the former management of the treated wood, including the resuspension by circulation of vehicles on unpaved roads.

Acknowledgments

M.V. Coronas gratefully acknowledges the Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) for the doctoral scholarship. This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), grants n° 573993/2008-4 - INAGEMP and 555187/2006-3 - EcoRISCO-SAÚDE.

References

ATSDR Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2001) Toxicological Profile for Pentachlorophenol Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. 2001. Available in: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=402&tid=70>

Bernstein L, Kaldor J, McCann J, Pike MC (1982) An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. *Mutat Res* 97:267–81.

Bhattacharjee, P., Banerjee, M., Giri, A.K., 2013. Role of genomic instability in arsenic-induced carcinogenicity. A review. *Environ Int* 53: 29–40.

Bhattacharya P, Mukherjee AB, Jacks G, Nordqvist S (2002) Metal contamination at a wood preservation site: characterisation and experimental studies on remediation. *Sci Total Environ* 290:165–80.

Brasil (2006) Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa nº 132, de 10 de novembro de 2006 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis [Brazil (2006) Ministry of Environment. Normative Instruction No. 132 of November, 10th 2006 by the Brazilian Institute of Environment and Natural Resources], IBAMA, Brasília, Brazil, 2006; <http://www.ibama.gov.br/qualidadeambiental/madeira/>.

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. [Brazil (2009) CONAMA Administrative Ruling no 420 of December 28, 2009. About criteria and values guiding soil quality as to the presence of chemicals. The ruling also establishes guidelines for the environmental management of areas contaminated by these substances as a result of anthropic activities]. CONAMA, Brasília, Brazil, 2009; <http://www.mma.gov.br/conama>.

- Callan AC, Winters M, Barton C, Boyce M, Hinwood AL (2012) Children's Exposure to Metals: A Community-Initiated Study. *Arch Environ Contam Toxicol* 62:714–22.
- Caravanos J, Weiss AL, Jaeger RJ (2006) An exterior and interior leaded dust deposition survey in New York City: Results of a 2-year study. *Environ Res* 100:159–64.
- da Costa TC, de Brito KCT, Rocha JAV, Leal Karen Alam, Rodrigues MLK, Minella JPG, Matsumoto ST, Vargas VMF (2012) Runoff of genotoxic compounds in river basin sediment under the influence of contaminated soils. *Ecotoxicol Environ Saf* 75:63–72.
- Dahlgren J, Takhar H, Schechter A, Schmidt R, Horsak R, Paepke O, Warshaw R, Lee A, Anderson-Mahoney P (2007) Residential and biological exposure assessment of chemicals from a wood treatment plant. *Chemosphere* 67:S279–S285.
- Dahlgren J, Warshaw R, Thornton J, Anderson-Mahoney P, Takhar H (2003a) Health effects on nearby residents of a wood treatment plant. *Environ Res* 92:92–8.
- Dahlgren J, Warshaw R, Horsak RD, Parker III FM, Takhar H (2003b) Exposure assessment of residents living near a wood treatment plant. *Environ Res* 92:99–109.
- Davis JJ, Gulson BL (2005) Ceiling (attic) dust: A “museum” of contamination and potential hazard. *Environ Res* 99:177–94.
- Feng L, Wu C, Sutherland AJ, Clark JJ, Rosenfeld PE (2011) Dioxin furan blood lipid and attic dust concentrations in populations living near four wood treatment facilities in the United States. *Journal of Environ Health* 73:34–46.

FEPAM Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler (2010) Qualidade das águas da bacia hidrográfica do rio das Antas e do rio Taquari [FEPAM Environmental Protection State Foundation (2010) Water quality in basin rivers Antas and Taquari]. FEPAM, Porto Alegre, Brazil, <http://www.fepam.rs.gov.br>

FEPAM Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler (2010) Estratégias ecotoxicológicas para caracterizar áreas contaminadas como medida de risco à saúde de populacional. [FEPAM Environmental Protection State Foundation Ecotoxicological strategies to characterize contaminated areas to as a measure of population health risk]. Vargas, V.M.F. (coord.) Eco-Risco Saúde Project Report., FEPAM, Porto Alegre, Brazil

Gallego E, Roca FJ, Perales JF, Guardino X, Berenguer MJ (2008) VOCs and PAHs emissions from creosote-treated wood in a field storage area. *Sci Total Environ* 402:130–8.

Gevao B, Al-Bahloul M, Zafar J, Al-Matrouk K, Helaleh M (2007) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Indoor Air and Dust in Kuwait: Implications for Sources and Nondietary Human Exposure. *Arch Environ Contam Toxicol* 53:503–12.

Gichner T, Wagner ED, Plewa MJ (1998) Pentachlorophenol-mediated mutagenic synergy with aromatic amines in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res* 420:115–24.

Gonzalez J, Feng Lydia, Sutherland A, Waller C, Sok H, Rob Hesse PG, Paul Rosenfeld PD (2011) PCBs and dioxins/furans in attic dust collected near former PCB production and secondary copper facilities in Sauget, IL. *Procedia Environ Sci* 4:113–25.

- Hensley AR, Scott A, Rosenfeld PE, Clark JJJ (2007) Attic dust and human blood samples collected near a former wood treatment facility. *Environ Res* 105:194–9.
- Hingston J., Collins C., Murphy R., Lester J (2001) Leaching of chromated copper arsenate wood preservatives: a review. *Environ Pollut* 111:53–66.
- Hoh E, Hunt RN, Quintana PJE, Zakarian JM, Chatfield DA, Wittry BC, Rodriguez E, Matt GE (2012) Environmental Tobacco Smoke as a Source of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Settled Household Dust. *Environ Sci Technol* 46:4174–83.
- Hughes M (2002) Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett* 133:1–16.
- IARC International Agency for Research on Cancer (2010) Agents Classified by the IARC Monographs Volumes 1–102, IARC: Lyon, France. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>
- Kado NY, Guirguis GN, Flessel CP, Chan RC, Chang K-I, Wesolowski JJ (1986) Mutagenicity of fine (< 2.5 µm) airborne particles: Diurnal variation in community air determined by a salmonella micro preincubation (microsuspension) procedure. *Environ Mutagen* 8:53–66.
- Kang Y, Cheung KC, Wong MH (2011) Mutagenicity, genotoxicity and carcinogenic risk assessment of indoor dust from three major cities around the Pearl River Delta. *Environ Int* 37:637–43.
- Karouna-Renier NK, Rao KR, Lanza JJ, Davis DA, Wilson PA (2007) Serum profiles of PCDDs and PCDFs, in individuals near the Escambia Wood Treating Company Superfund site in Pensacola, FL. *Chemosphere* 69:1312–9.

- Lambert TW, Lane S (2004) Lead, Arsenic, and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil and House Dust in the Communities Surrounding the Sydney, Nova Scotia, Tar Ponds. *Environ Health Perspect* 112:35–41.
- Maertens RM, Bailey J, White PA (2004) The mutagenic hazards of settled house dust: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutat Res* 2004;567:401–25.
- Maertens RM, Yang X, Zhu J, Gagne RW, Douglas GR, White PA (2008a) Mutagenic and carcinogenic hazards of settled house dust I: Polycyclic aromatic hydrocarbon content and excess lifetime cancer risk from preschool exposure. *Environ Sci Technol* 42:1747–53.
- Maertens RM, Gagné RW, Douglas GR, Zhu J, White PA (2008b) Mutagenic and Carcinogenic Hazards of Settled House Dust II: Salmonella Mutagenicity. *Environ Sci Technol* 42:1754–60.
- Mannino MR, Orecchio S (2008) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in indoor dust matter of Palermo (Italy) area: Extraction, GC–MS analysis, distribution and sources. *Atmos Environ* 42:1801–17.
- Maron DM, Ames BN (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 113:173–215.
- Mercier F, Glorennec P, Thomas O, Bot BL (2011) Organic Contamination of Settled House Dust, A Review for Exposure Assessment Purposes. *Environ Sci Technol*;45:6716–27.
- Moghaddam AH, Mulligan CN (2008) Leaching of heavy metals from chromated copper arsenate (CCA) treated wood after disposal. *Waste Manag* 28:628–37.

Pohren R de S, Rocha JAV, Leal Karen Alan, Vargas VMF (2012) Soil mutagenicity as a strategy to evaluate environmental and health risks in a contaminated area. *Environ Int* 44:40–52.

Rossman TG (2003) Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutat Res* 533:37–65.

Seiler JP (1991) Pentachlorophenol. *Mutat Res* 257:27–47.

WHO World Health Organization (2010) WHO guidelines for indoor air quality selected pollutants. WHO, Copenhagen.

USEPA United States Environmental Protection Agency (1995) SW-846 EPA. Method 3051, Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils. In: Test methods for evaluating solid wastes: Physical chemical methods. 3.ed. Washington.

USEPA United States Environmental Protection Agency (2011) Regional Screening Levels for Chemical Contaminants at Superfund Sites U.S.EPA: Washington, D.C., 2011. <http://www.epa.gov/region09/superfund/prg/>

3. Avaliação de área contaminada por atividades de tratamento de madeira: biomarcadores genéticos ambientais e na população humana

*Artigo a ser submetido para *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. Co-autores: Jocelita Aparecida Vaz Rocha, Daisy Maria Favero Salvadori e Vera Maria Ferrão Vargas

**Avaliação de área contaminada por atividades de tratamento de madeira:
biomarcadores genéticos ambientais e na população humana**

Mariana Vieira Coronas^{a, b, c}, Jocelita Aparecida Vaz Rocha^b, Daisy Maria Favero Salvadori^d,
Vera Maria Ferrão Vargas^{*a, b, c}

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

^b Programa de Pesquisas Ambientais, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM), Rua Doutor Salvador França, 1707, 90690-000, Porto Alegre, RS, Brasil.
E-mail: ecorisco@fepam.rs.gov.br Fone/Fax: 51 33344583

^c INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Rio de Janeiro, Brasil

^d Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP—Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

*Autor para correspondência:

Vera Maria Ferrão Vargas

Tel/Fax:+51-33346765

e-mail: ecorisco@fepam.rs.gov.br

Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM)

Avenida Salvador França, 1707 CEP: 90690-000.

Porto Alegre, RS, Brasil.

Resumo

As atividades de preservação da madeira e compostos relacionados é uma problemática em vários locais do mundo, pois estas áreas passam por grandes passivo de contaminação ambiental comprometendo a saúde da população do entorno e a integridade dos processos ecológicos. O presente estudo avaliou uma área influenciada pela contaminação do solo originada das atividades de uma usina de tratamento de madeira desativada. A presença e o efeito de compostos mutagênicos em amostras ambientais foram utilizados como marcadores de exposição aliado a avaliação de marcadores genéticos de efeito na população humana, enfocando crianças como grupo sensível. Extratos orgânicos de amostras de água destinada ao abastecimento público e de material particulado atmosférico fino (PM_{2,5}) foram avaliados quanto ao potencial mutagênico pelo ensaio *Salmonella*/microssoma. Amostras de sangue e de mucosa oral de crianças residentes no entorno da área da usina foram analisadas quanto a presença de danos genéticos e comparadas as de um grupo de crianças residentes em área mais afastada, fora do quadrante preferencial de dispersão atmosférica e em oposição à drenagem do local. As resposta de atividade mutagênica para amostras de PM_{2,5}, assim como a concentração de HPAs, foram, de forma geral mais elevadas na área de risco, embora em alguns períodos a área de referência tenha alcançado valores similares e até superiores. A linhagem YG1021 de *S. typhimurium* se mostrou mais sensível na detecção de compostos nitroderivados do que a YG1024. O efeito mutagênico e as concentrações de HPAs encontrados foram similares a estudos que avaliaram áreas de intensa ocupação urbana e influência industrial. Os extratos de água destinada ao abastecimento apresentaram ausência de mutagenicidade. As frequências de MN em linfócitos de sangue periférico e de células binucleadas na mucosa oral foram significativamente maiores no grupo de risco. Nos demais biomarcadores de dano genético avaliados não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. O conjunto de resultados indica a necessidade de novas avaliações utilizando grupo de referência menos suscetível às influências da área contaminada.

Palavras-chave: *Salmonella*/microssoma; micronúcleo, ensaio cometa, PM_{2,5}, tratamento de madeira, HPAs

1. Introdução

O avanço do conhecimento para o estabelecimento de parâmetros eficazes para avaliação e diagnóstico ambiental é uma necessidade crescente diante dos efeitos das atividades humanas que afetam a saúde do ecossistema e da própria população humana. Marcadores de eventos biológicos, biomarcadores, que têm sido bastante empregados para avaliar a exposição ocupacional, estão sendo hoje utilizados para investigar os efeitos causados por misturas complexas de origem ambiental (Ryan et al., 2007).

Na avaliação de exposição ambiental, a escolha do parâmetro medido deve considerar as fontes potenciais de contaminação, a dinâmica e propriedades das substâncias no ambiente. Além disso, o grupo de organismos escolhidos também é elemento importante a ser considerado. Uma vez que a exposição possa ser similar para a população, os riscos associados serão distintos nos diferentes estágios de desenvolvimento (Pohl & Abadin, 2008). Nesse contexto, entre os diversos grupos populacionais, as crianças estão entre os mais sensíveis por apresentarem maior influxo proporcional diário de água, alimento e ar em relação ao peso corpóreo; por estarem em fase de rápido crescimento; pela fato dos processos fisiológicos serem mais facilmente perturbados; por serem mais susceptíveis a danos neurológicos e a danos à molécula de DNA, por apresentarem epitélio do sistema respiratório mais permeável; e por comportamentos infantis, como por exemplo, levarem mãos e objetos à boca (Neri et al., 2006a; Neri et al., 2006b; Pohl & Abadin, 2008; Salvi, 2007).

A análise de micronúcleo (MN) é um método citogenético eficiente para a avaliação de alterações cromossômicas. O MN é formado por fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo no momento da mitose (Fenech & Bonassi, 2011). Assim, o teste para detecção de micronúcleo vem sendo bastante utilizado para a avaliação do efeito da contaminação

ambiental em populações humanas (Fenech & Bonassi, 2010; Holland et al. 2008; Holland et al. 2011). Além desse, o ensaio do cometa vem sendo também amplamente utilizado, pois detecta alterações no nível molécula, ou seja, lesões diretamente na molécula do DNA (efeito genotóxico). Foi relatado, por exemplo, que o teste do cometa é bastante sensível na detecção de danos causados por uma ampla variedade de contaminantes ambientais, dentre os quais pesticidas, poluentes atmosféricos, metais, entre outros (Valverde & Rojas, 2009). A combinação desses dois métodos, micronúcleo e cometa, permitem, portanto, a detecção de maior espectro de alterações genéticas, uma vez que o primeiro traz informações de danos citogenéticos que não são passíveis de reparo, o ensaio do cometa, lesões moleculares que indicam a capacidade do agente atingir o DNA que são ainda passíveis de reparo.

Somado à avaliação de marcadores genéticos na população, uma análise que identifique a presença de substâncias no ambiente e o efeito biológico da mistura permite abordagem mais adequada para diagnóstico e monitoramento ambiental, evidenciando as causas do efeito observado. Uma vez que os métodos mais diretamente relacionados à saúde humana levam a conclusões genéricas, outros métodos, como a análise química e a avaliação de mutagenicidade, fornecem informações sobre os mecanismos de ação e são facilmente utilizados para comparações (Claxton et al., 2004; Claxton & Woodall Jr, 2007).

Devido às possibilidades de reações e transformações da matéria, a avaliação de misturas complexas somente pela caracterização química pode se tornar um trabalho infundável e incompleto. Neste contexto, a identificação de parâmetros simples e eficazes, mas que expressem essa complexidade favorece a prevenção e controle ambiental. O material particulado atmosférico é um exemplo dessas misturas complexas. Formado por partículas orgânicas e inorgânicas em suspensão, o material

particulado atmosférico normalmente é classificado e avaliado conforme seu tamanho aerodinâmico em Partículas Totais em Suspensão (PTS), partículas de até 100 μ m, Partículas Inaláveis (PM10), menores que 10 μ m, Partículas Finas Inaláveis (PM2,5) menores que 2,5 μ m, e Ultra Finas (UF), menores que 0,1 μ m. A concentração dessas frações deve ser utilizada com cautela como índice da qualidade do ar, pois diversos estudos já relataram efeito mutagênico em diferentes concentrações (Coronas et al., 2008; Coronas et al., 2009; Lemos et al., 2012; Pereira et al., 2010; Vargas et al., 2011) e a maioria dessas avaliações estavam abaixo dos padrões máximos estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) para PTS e PM10 no Brasil (Brasil, 1990)

A presença de poluentes no compartimento atmosférico não é apenas resultado das emissões atmosféricas, pois ressuspensão e vaporização dos compostos podem levar substâncias presentes em solos e água contaminados para o ar. Assim, muitas vezes a caracterização de uma contaminação e sua abrangência requer uma avaliação extensa. A contaminação nos diversos compartimentos ambientais das atividades de preservação da madeira já foi reportada em vários locais pelo mundo (da Costa et al. 2012; Dalhgren et al. 2003; Dalhgren et al. 2007; Feng et al. 2011; Hensley et al. 2007; Pohren et al. 2012). Ao longo dos anos, os processos e as substâncias usadas para o tratamento de madeira foram modificados em razão da descoberta da toxicidade destas substâncias químicas. Entre as substâncias usadas, creosoto, pentaclorofenol e hidrossal CCA eram empregados com frequência gerando em muitas áreas passivo de contaminação com potencial de dispersão, ameaçando a saúde e a qualidade ambiental (Bhattacharya et al. 2002; Dalhgren et al. 2007).

Creosoto é uma mistura complexa que contém centenas de compostos predominando os hidrocarbonos aromáticos, incluindo os hidrocarbonetos policíclicos

aromáticos (HPAs) (Gallego et al., 2008). Os HPAs estão presentes por todo o ambiente e na atmosfera são encontrados tanto no estado gasoso quanto associado às partículas. Dezesesseis HPAs são listados como poluentes prioritários no monitoramento ambiental pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), e desses oito são listados pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC) pelo seu potencial genotóxico (IARC, 2010). O pentaclorofenol (PCP) é um pesticida organoclarado que apresenta dioxinas e furanos como impurezas. A comercialização e uso de PCP e seus sais para atividades destinadas a preservação da madeira estão proibidos no Brasil desde 2007 (IBAMA, 2006). A IARC listou o creosoto como provavelmente carcinogênico para humanos e o PCP como possivelmente carcinogênico para humanos (IARC, 2010). O arseniato de cobre (hidrosal CCA) é composto por cobre, cromo e arsênio, sendo esses dois últimos metais tóxicos. O arsênio e compostos de arsênio e cromo hexavalente (Cr (VI)) são carcinogênicos para o ser humano (IARC, 2010).

Portanto, o objetivo deste estudo foi identificar a presença de compostos mutagênicos em amostras ambientais (PM_{2,5} e água destinada ao abastecimento público) como marcadores de exposição e a avaliação de biomarcadores genéticos de efeito em população humana, com foco em crianças residentes no entorno de uma área que apresenta contaminação do solo por substâncias utilizadas na preservação madeira.

2. Material e Métodos

2.1 Área de Estudo

A área investigada apresenta contaminação de solo específica (preservantes de madeira) oriunda das atividades de uma usina de tratamento de madeira. O local está situado na Depressão Central no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Figura 1),

estando próximo à confluência dos rios Taquari e Jacuí, percorrido por corpos d'água associados, em direção à drenagem principal, formando sub-bacias. O terreno é plano, com pequena declividade no sentido oeste-noroeste. O local é geologicamente caracterizado por solos aluvionares recentes, constituindo um pacote de cascalhos intercalados com areia, areias argilosas e argilas.

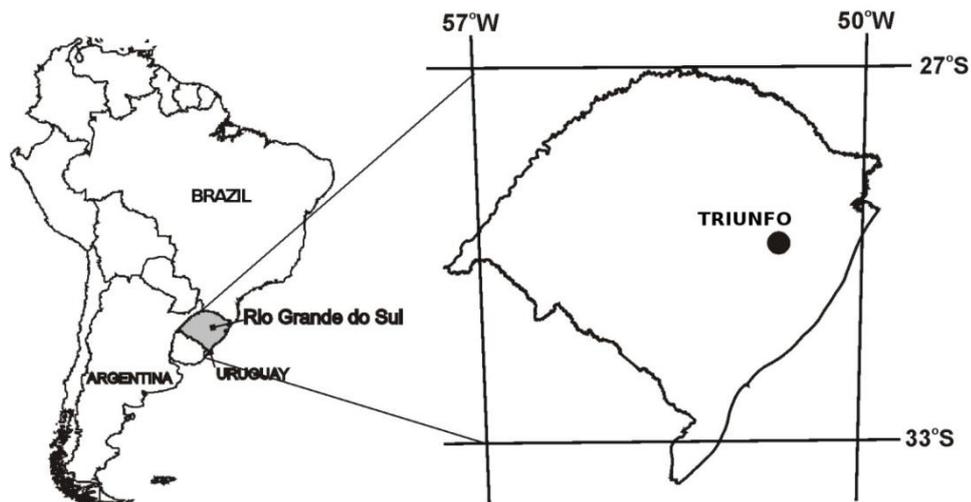


Figura 1 Localização da área estudada.

A empresa relacionada com atividade de preservação de madeira, já desativada, localiza-se à margem esquerda do rio Taquari, no distrito de Barreto, Triunfo, RS (Figura 2). No entorno da unidade existe núcleo habitacional, algumas culturas agrícolas, observando-se alguns estabelecimentos comerciais de pequeno porte (mercados, lojas de material de construção, lojas de roupas, bares e lanchonetes). Na margem direita do rio, o uso preponderante é agrícola.

Em atividade a partir de 1960, ano em que foi instalado o tratamento da madeira em autoclave, a empresa destinava-se a exploração, produção, preservação, fabricação, compra e venda no mercado interno e externo de postes de iluminação elétrica e/ou produtos derivados de madeira. Os produtos químicos usados para tratamento da madeira foram solução de pentaclorofenol em óleo e/ou óleo de creosoto, substituído

pelo tratamento alternado do uso de creosoto e o hidrossal CCA (Cobre-Cromo-Arsênio), desde 1982. A partir de 1998, a empresa passou a empregar o hidrossal exclusivamente como preservante no tratamento da madeira. Em 2005 as atividades foram encerradas, mas um passivo de contaminação ambiental permaneceu na área.

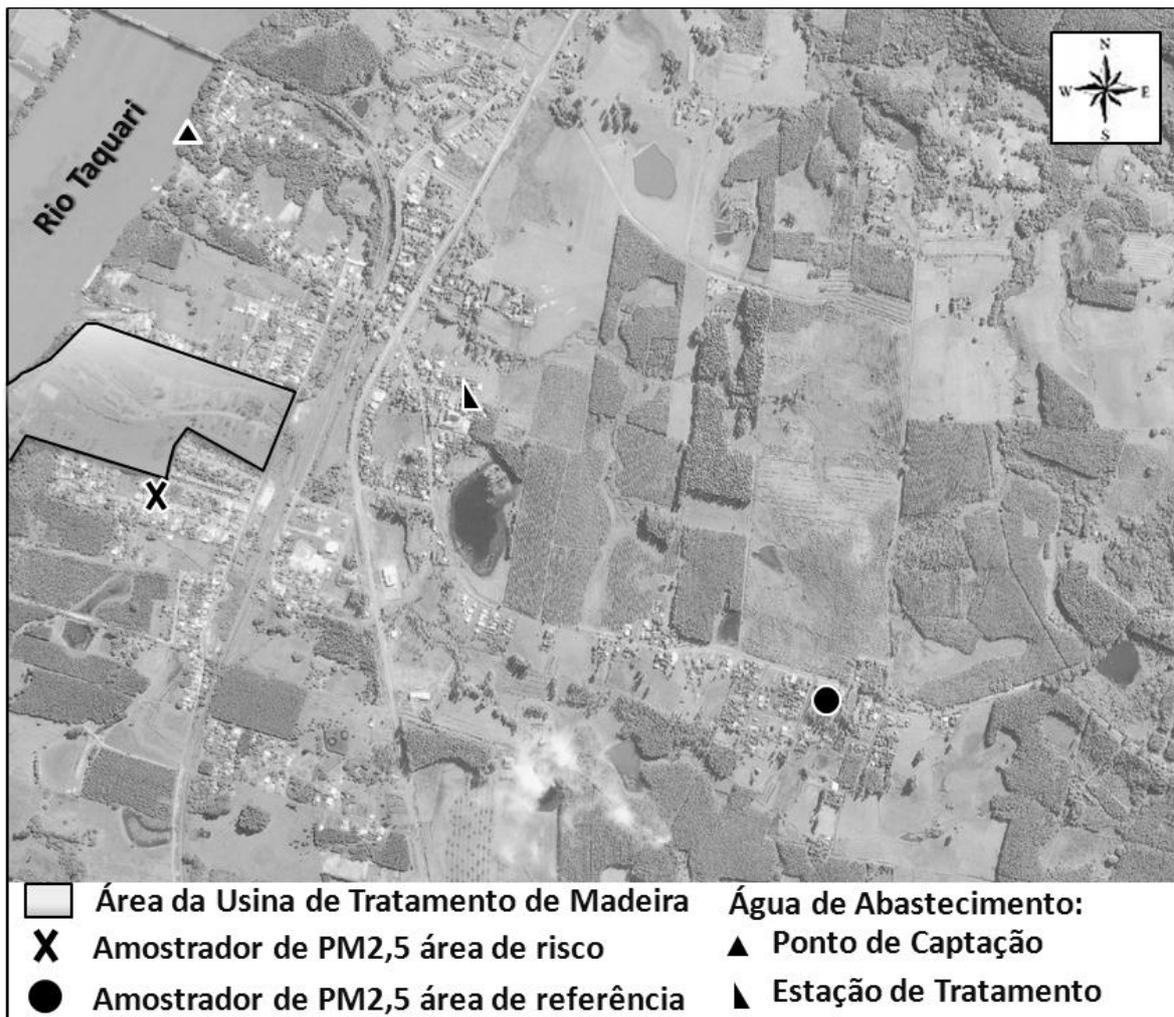


Figura 2 Localização da área estudada, dos amostradores de grandes volume de ar para PM_{2,5} e dos pontos de captação e da estação de tratamento de água.

2.2 Marcadores Ambientais

A avaliação dos marcadores ambientais e populacionais foi realizada no mesmo período na tentativa de identificar o fluxo dos contaminantes e as possíveis vias de exposição. Para isso foi conduzida a investigação na fração PM_{2,5} de partículas atmosféricas e na água destinada ao abastecimento público. A presença de contaminantes orgânicos, além do potencial efeito mutagênico foram avaliados para as amostras de PM_{2,5}.

2.2.1 Material Particulado Atmosférico (PM_{2,5})

Na área de estudo foram instalados dois amostradores de grandes volume AGVs da ASI/GMW (Andersen Samplers Inc/General Metal Works) para coleta de partículas de até 2,5 µm em suspensão (PM_{2,5}) no ar ambiente. Sendo uma considerada a área sob influência da contaminação proveniente da usina (risco) e a outra, a de menor influência (referência) distante 1,75 Km e fora do quadrante preferencial de dispersão dos ventos (Figura 2). A definição do local para instalação dos amostradores foi a partir de estudo prévio que buscou identificar a rota atmosférica de dispersão dos poluentes (Coronas et al., 2012). A amostragem era conduzida por um período de 24 horas semanalmente em dois períodos distintos: um inicial para caracterização (de maio a agosto de 2009) e outro simultaneamente ao estudo de biomarcadores genéticos populacionais (de outubro de 2009 a fevereiro de 2010). No primeiro período foram coletados 16 filtros em cada local (risco e referência) que foram agrupados em *pools* mensais para extração dos compostos orgânicos e posterior avaliação dos HPAs e potencial mutagênico. No segundo período foram coletados cinco filtros em cada local que foram extraídos individualmente.

As amostras eram recolhidas em filtros de membrana, constituída por microfibras de vidro de borosilicato puro, reforçada com lã de vidro e com PTFE – Politetrafluoretileno (MFAB TX40HI20-WW). Cada filtro foi pesado antes e após a coleta para determinação da massa de partículas coletadas. O volume de ar amostrado foi determinado a partir da vazão medida e do tempo de amostragem. A concentração de PM_{2,5} foi calculada dividindo-se a massa de partículas coletada pelo volume de ar amostrado, sendo expressa em microgramas por metro cúbico ($\mu\text{g}/\text{m}^3$).

Os filtros contendo PM_{2,5} eram divididos em quatro partes iguais e uma dessas partes submetida à extração com solvente diclorometano (DCM) pela técnica de ultrassom (Vargas et al., 1998) que extrai compostos moderadamente polares, onde se encontra a maior fração e variedade de compostos orgânicos mutagênicos (Claxton et al., 2004). O percentual de matéria orgânica extraída (MOE%) foi calculado e a massa total obtida na extração comparada ao volume de ar amostrado para determinação da concentração de MOE em $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Anteriormente à realização do ensaio biológico o extrato era seco com nitrogênio gasoso e ressuspenso em dimetilsulfóxido (DMSO).

2.2.2 *Água destinada ao Abastecimento*

Amostras da água antes e após tratamento foram coletadas no dia 29 de janeiro de 2010 na Estação de Tratamento de Água (ETA) de Barreto que abastece a população residente na área estudada. O ponto de captação de água da ETA fica no rio Taquari (29°52'1,76"S, 51°42'42,57"W), próximo, mas a montante, da área da usina de tratamento de madeira (Figura 2). Foram coletados 40 litros para extração sequencial por adsorção em resinas do tipo Amberlite XAD4 (1 mL/L de amostra), em pH natural e acidificada pela adição de HCl até pH 2,0. A coluna foi tratada com solventes metanol, éter etílico, diclorometano e água ultrapurificada (1:1:2:3). A eluição dos compostos em

pH natural foi realizada em metanol/diclorometano (1:4) retirando compostos moderadamente polares e apolares. A eluição ácida foi realizada em metanol/etilo acetato, para compostos polares. Os eluatos foram concentrados em rotavapor até um volume de 10mL. A massa obtida foi medida em balança analítica de cinco casas (Cardozo et al., 2006; Pereira et al., 2007). Essas amostras foram investigadas quanto à presença de efeito mutagênico.

2.2.3 *Análise dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)*

No extrato orgânico das amostras de PM_{2,5} foi conduzida a quantificação dos 16 HPAs classificados como poluentes prioritários pela agência ambiental dos Estados Unidos (USEPA): Acenafteno, Acenafteno, Antraceno, Benzo(a)antraceno, Benzo(a)pireno, Benzo(b)fluorantreno, Benzo(g,h,i)perileno, Indeno(1,2,3-cd)pireno, Benzo(k)fluorantreno, Criseno, Dibenzo(a,h)antraceno, Fenantreno, Fluorantreno, Fluoreno, Naftaleno e Pireno. A análise foi realizada em cromatógrafo gasoso com detector de espectrometria de massas, e injetor split/splitless, GC/MSD (Shimadzu QP-2010), utilizando-se como método de ionização o impacto eletrônico (EI) com energia de ionização de 70 eV. Para fins de comparação, também foram analisadas soluções padrão contendo os 16 HPAs nas concentrações de 100 ppb e 5 ppb ambas com 200 ppb do padrão interno bifenila nas mesmas condições cromatográficas das amostras.

2.2.4 *Ensaio Salmonella/microsoma*

A mutagenicidade dos extratos orgânicos de PM_{2,5} e água de abastecimento foi avaliada pelo ensaio *Salmonella/microsoma* (Maron & Ames, 1983), através do método de microsuspenção (Kado et al., 1986). Para cada amostra eram testadas pelo menos cinco concentrações em progressão geométrica de razão dois. A linhagem TA98, que mede erro no quadro de leitura do DNA, foi utilizada como diagnóstico inicial. Essa

linhagem abrange uma variedade de compostos, sendo o evento mutagênico de erro no quadro de leitura o mais sensível nos estudos com amostras de ar (Claxton et al., 2004; Ducatti & Vargas, 2003). Os extratos orgânicos das amostras de água de abastecimento também foram avaliados com a linhagem TA100 que marca substituição de pares de base do DNA. A presença e potencial mutagênico de nitrocompostos nas amostras de PM_{2,5} foi avaliada utilizando as linhagens YG1021 e YG1024 que apresentam alta atividade enzimática da nitroreductase e da *O*-acetiltransferase, respectivamente (Watanabe et al., 1989; Watanabe et al., 1990). Ainda foi avaliada a atividade de metabólitos em ensaios em presença de sistema de metabolização P450 de mamíferos *in vitro* (fração S9- homogenato de células de fígado de rato *Sprague-Dawley*, pré-tratado com AROCLOR1254, adquirida da Moltax - Molecular Toxicology, Inc). Os ensaios eram conduzidos sob luz amarela e na presença de controles negativo (DMSO 5µl/placa) e positivo (4-óxido-1- nitroquinoleína—4NQO, 0,5µg/placa, CASRN. 56-57-5; azida sódica—AZS, 0,5 µg/placa, CASRN. 26628-22-8; 2-nitrofluoreno —2NF, 0,15 µg/placa CASRN. 607-57-8; e 2-aminofluoreno—2AF, 1µg/placa, CASRN. 153-78-6 da Sigma Chemical Company, St.Louis, MO).

2.3 Biomarcadores genéticos na população

Este estudo, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o questionário aplicado à população foram aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas como um adendo ao processo já existente - Projeto Nº 07-042: *Estratégias ecotoxicológicas para caracterizar áreas contaminadas como medida de risco à saúde de populacional*.

A avaliação dos biomarcadores na população foi conduzida em crianças com idade entre 5 e 12 anos de famílias que habitam a localidade estudada, residindo nos

arredores da usina de tratamento de madeira. Todas as crianças além de residir na localidade frequentavam uma das três escolas de ensino infantil ou fundamental pública existentes no bairro. O grupo controle (referência) foi constituído por crianças que habitam áreas de menor exposição, ou seja, áreas fora do local de maior influência e escolhidas tendo por base os estudos de dispersão atmosférica regional e escoamento do lençol freático. No entanto esse núcleo populacional era menor, não havendo número de crianças da faixa etária avaliada para completar o mesmo tamanho amostral do grupo de risco. Como marcadores genéticos foram utilizados os testes do cometa e do micronúcleo em células do sangue periférico e da mucosa oral (Kassie et al., 2000; Singh et al., 1988; Speit & Hartmann, 1999).

2.3.1 Coleta e amostragem

Antes da coleta do material biológico, o responsável pela criança foi informado sobre os objetivos e procedimentos da pesquisa e respondeu a um questionário sobre o histórico de saúde e hábitos da criança. De cada criança voluntária foi feita a coleta de cerca de 4 mL de sangue por meio de punção intravenosa com agulhas e seringas descartáveis estéreis. Após a coleta a amostra foi imediatamente transferida para tubos estéreis contendo solução anticoagulante (heparina). No mesmo momento foram coletadas amostra de células da mucosa oral, com escova de polietileno, as quais foram transferidas para solução salina fisiológica (NaCl 0,9%). Os frascos com as amostras foram rotulados e mantidos a 4°C e ao abrigo de luz até o momento do processamento.

2.3.2 Teste do Cometa

A partir da amostra de sangue os linfócitos foram isolados por gradiente de Ficoll[®] e a viabilidade celular avaliada pela coloração de *Trypan Blue*. Os linfócitos foram então misturados a agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37°C e transferidos

para uma lâmina previamente gelatinizada com agarose regular (1,5%). Posteriormente, a lâmina foi colocada em solução gelada de lise (2,5M NaCl; 100mM EDTA; 10mM Tris; 1% N-Lauroyl-Sarcosinato; 1% TritonX-100, 10% dimetilsulfóxido - DMSO), por aproximadamente 12h. Após esse período, as lâminas foram transferidas para uma cuba horizontal de eletroforese e imersas em solução alcalina (10N NaOH; 200mM EDTA; pH>13) à 4°C. Após 20 minutos (tempo de desenrolamento das fitas de DNA) foi realizada a eletroforese com voltagem de 25V (300mA) por 20 minutos. Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas com solução de neutralização (0,4M Tris-HCl; pH 7,5) por três vezes e fixadas em etanol absoluto. Após secas, as lâminas foram estocadas refrigeradas até o momento da análise, quando eram coradas com solução de brometo de etídio e avaliadas em microscópio de fluorescência acoplado a sistema de análise de imagem (*Comet Assay IV*, da *Perceptive Instruments* - Suffolk, UK). Para cada indivíduo foram analisados 100 nucleóides (50 em cada lâmina) e a porcentagem de fragmentos de DNA na cauda do cometa (*tail intensity*) foi utilizada como parâmetro para a medição de danos genéticos. Como controle negativo e positivo (linfócitos tratados com H₂O₂ a 200 µM) da técnica foi usado amostra de um doador de fora do grupo de estudo.

2.3.3 Teste do micronúcleo

As células da mucosa oral, amostradas e acondicionadas em solução salina fisiológica (0,9%) foram centrifugadas por três vezes e fixadas com solução de metanol e ácido acético (3:1). Na coloração das células foi empregado o método de *Feulgen/fast green*. As lâminas foram analisadas em microscópio com objetiva de alta resolução (1000x) para a contagem das células conforme método e descrição apresentada por Thomas et al. (2009). Foram analisadas 1000 células para a avaliação da frequência de brotos nucleares (indicativo de amplificação de gene), células binucleadas (causada por

falhas na citocinese) e várias formas de morte celular como cromatina condensada, cariorréxe, picnose e cariólise (Thomas et al., 2009). A frequência de biomarcadores de dano no DNA, brotos e micronúcleos, foi avaliada em 2000 células diferenciadas.

A cultura de linfócitos foi realizado conforme descrito em Fenech (2000) e Salvadori et al. (2003). As lâminas foram coradas por Giemsa e analisadas em microscopia óptica de luz em aumento de 400 vezes. Para cada indivíduo, foram analisadas 2000 células (com membrana e núcleo intactos). Para a definição de micronúcleo foi utilizado o critério de Tolbert et al. (1992).

2.4 Análise dos Dados

A curva dose-resposta obtida nos ensaios de mutagenicidade (ensaio *Salmonella*/microsoma) foi avaliada por análise de regressão utilizando o programa computacional SALANAL (*Salmonella Assay Analysis*, versão 1.0), onde um valor de colônias revertentes por unidade de amostra (mL para água de abastecimento e, para PM_{2,5}, µg ou m³) foi estimado. A amostra foi considerada positiva quando uma curva dose-resposta reproduzível e ANOVA eram significantes ($p < 0,05$).

A análise dos dados do ensaio cometa foi realizada utilizando o parâmetro intensidade da cauda (% DNA na cauda do cometa) para comparar o grupo sob influência da área contaminada em relação ao grupo de referência. Foi utilizada a Análise de Variância com Modelos Hierárquicos. Nessa análise os fatores são organizados em níveis dentro de uma ordem específica (células são considerados dentro do sujeito e este dentro do grupo), permitindo a avaliação de toda variação dos danos.

Foram utilizados Modelos Lineares Generalizados com distribuição de Poisson para avaliar diferença na frequência de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico e em micronúcleos e brotos nucleares em células esfoliadas da mucosa oral. Para

avaliação dos demais parâmetros de alteração nuclear (células basais, diferenciadas, picnose, cromatina condensada, cariorréxe e cariólise) em células de mucosa oral foram utilizados Modelos Lineares Generalizados com distribuição binomial negativa. O nível de significância adotada foi 5%. As análises foram realizadas usando o pacote SPSS para Windows, versão 18 e o pacote estatístico SAS (Proc Mixed-Statistical Analysis System) versão 9.1.

3. Resultados e Discussão

3.1 Material Particulado Atmosférico (PM_{2,5})

A concentração média de PM_{2,5} para 24h de amostragem nesses dois períodos de estudo são apresentadas na figura 3. No Brasil não há parâmetros para o controle e avaliação de PM_{2,5}, mas a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda um limite de 25 µg/m³ (OMS, 2006). No primeiro período de amostragem dez vezes essa concentração foi ultrapassada, cinco na área de risco e cinco na área de referência, sendo 32µg/m³ a maior concentração registrada em agosto nos dois locais. No segundo período de amostragem apenas uma vez em cada local essa concentração foi ultrapassada, 33 e 35 µg/m³ na área de referência e risco, respectivamente.

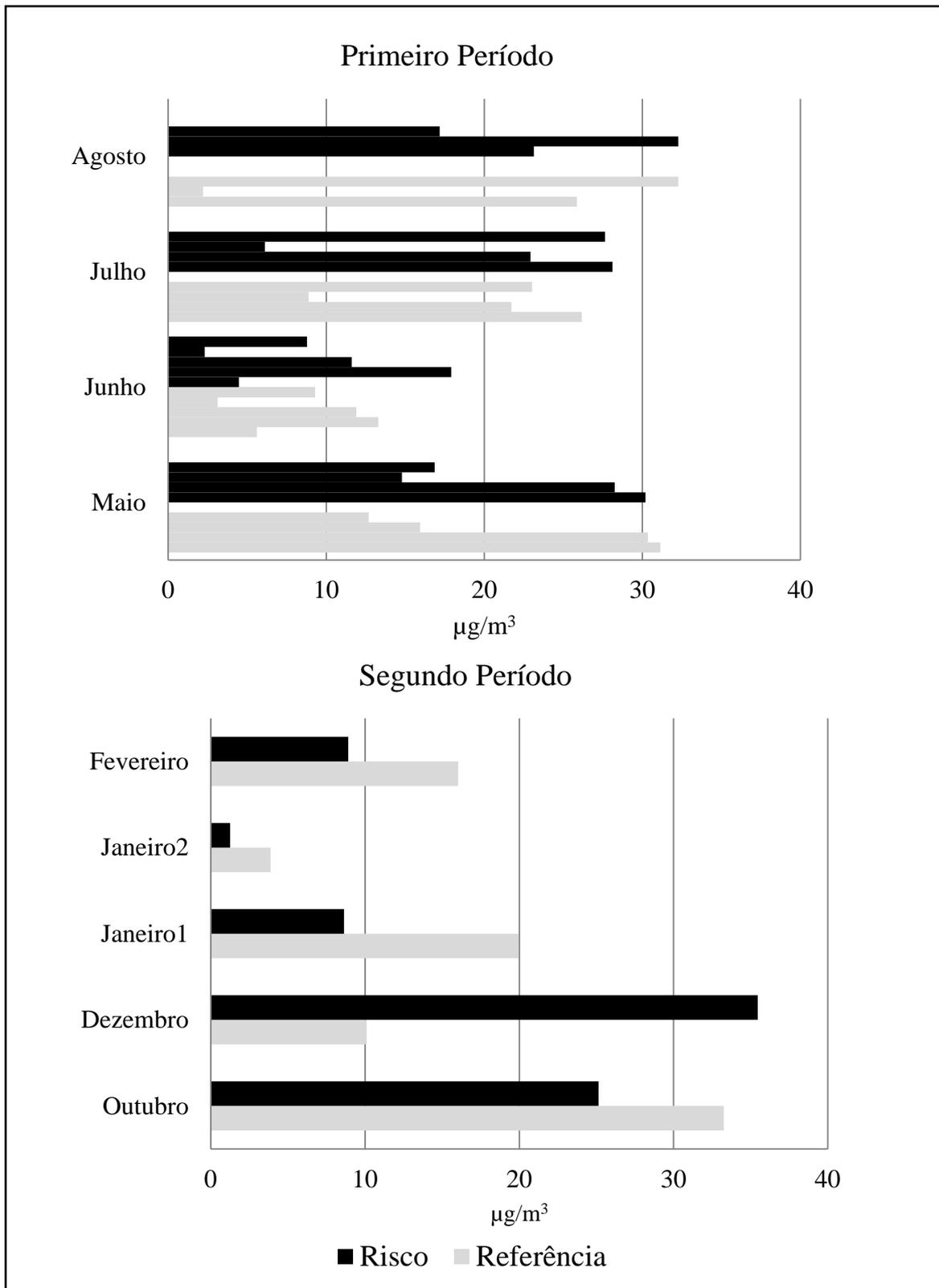


Figura 3 Concentração média de partículas de PM_{2,5} em amostragens de 24h para os dois períodos de estudo nas áreas de risco (sob influência de contaminantes da atividade de preservação de madeira) e área de referência no distrito de Barreto, município de Triunfo, RS.

3.1.1 Mutagenicidade e Avaliação de HPAs no Material Particulado Fino Atmosférico (PM_{2,5})

A atividade mutagênica expressa em número de colônias revertentes/m³ de ar (rev/m³) foram maiores para a área de risco em relação aos valores obtidos na área de referência para a maioria das amostras em ensaios em ausência de metabolização e em todas na presença de metabolização para a linhagem TA98 no primeiro período de amostragem (Tabela 1). O aumento no número de revertentes/μg de matéria orgânica extraída para as linhagens YGs em relação a parental TA98 é um indicativo da presença de compostos nitroderivados com atividade mutagênica nas amostras (Watanabe et al., 1989; Watanabe et al., 1990). Esse aumento no número de colônias revertentes nas linhagens YG foi observado para todas as amostras desse mesmo período, e a linhagem YG1021 apresentou respostas mais elevadas para a maioria das amostras, em especial na área de risco indicando a presença de nitroarenos (Tabela 1). Conforme a experiência do grupo de pesquisa em trabalhos anteriores, a YG1021 geralmente é mais sensível a amostras de material particulado de áreas urbanas (Coronas et al., 2008; Coronas et al., 2009; Käffer et al., 2012; Lemos et al., 2012; Vargas et al. 2011).

No segundo período de amostragem, onde a extração orgânica de PM_{2,5} foi realizada em filtro isolado, o potencial mutagênico, em valores de revertentes, foi menor, inclusive observadas respostas negativas (Tabela 1). De maneira similar ao primeiro período de estudo a linhagem YG1021 se mostrou a mais sensível para a maioria das amostras.

Tabela 1 Mutagenicidade em linhagens de *S. typhimurium* por unidade de massa de matéria orgânica extraída (revertentes/ μg) e por volume de ar amostrado (revertentes/ m^3) nos extratos orgânicos de $\text{PM}_{2,5}$ para os dois períodos de estudo nas áreas de risco (sob influência de contaminantes da atividade de preservação de madeira) e área de referência no distrito de Barreto, município de Triunfo, RS.

Amostra	Local	MOE	revertentes/ m^3		revertentes/ μg		
			TA98	TA98+S9	TA98	YG1021	YG1024
<i>Primeiro período</i>							
Maio/09	Referência	3,59	24,81 \pm 1,83	11,38 \pm 0,83	6,91 \pm 0,51	19,39 \pm 2,99	15,35 \pm 2,08
	Risco	3,69	23,99 \pm 2,07	11,84 \pm 1,59	6,50 \pm 0,56	25,51 \pm 1,48	10,69 \pm 1,49
Junho/09	Referência	1,34	4,19 \pm 0,38	1,72 \pm 0,35	3,13 \pm 0,28	14,16 \pm 1,02	5,66 \pm 0,62
	Risco	1,17	11,17 \pm 1,45	3,14 \pm 0,39	9,55 \pm 1,24	22,03 \pm 1,41	9,55 \pm 1,24
Julho/09	Referência	2,89	13,50 \pm 1,53	6,99 \pm 0,46	4,67 \pm 0,53	18,20 \pm 1,01	15,73 \pm 0,95
	Risco	3,86	17,14 \pm 1,39	9,15 \pm 0,68	4,44 \pm 0,36	10,68 \pm 1,14	6,94 \pm 1,30
Agosto/09	Referência	2,62	13,49 \pm 0,89	5,48 \pm 0,73	5,15 \pm 0,34	17,49 \pm 1,99	12,61 \pm 0,76
	Risco	2,32	8,70 \pm 1,02	10,83 \pm 1,14	3,75 \pm 0,44	18,48 \pm 1,82	15,54 \pm 0,81
<i>Segundo período</i>							
Outubro/09	Referência	1,42	6,42 \pm 0,78	NT	4,52 \pm 0,55	3,57 \pm 0,47	NT
	Risco	2,62	3,12 \pm 0,60	3,98 \pm 0,62	1,19 \pm 0,23	19,94 \pm 1,05	17,22 \pm 0,63
Dezembro/09	Referência	4,14	1,95 \pm 0,45	1,49 \pm 0,54	0,47 \pm 0,11	5,21 \pm 1,03	–
	Risco	3,08	–	3,08 \pm 1,11	–	3,17 \pm 0,22	2,32 \pm 0,28
Janeiro 1/10	Referência	1,64	2,33 \pm 0,36	–	1,42 \pm 0,22	6,72 \pm 0,60	13,55 \pm 1,40
	Risco	4,28	7,66 \pm 1,37	–	1,79 \pm 0,32	NT	NT
Janeiro 2/10	Referência	2,31	1,78 \pm 0,37	–	1,30 \pm 0,25	4,20 \pm 0,31	NT
	Risco	2,53	–	–	–	1,39 \pm 0,23	–
Fevereiro/10	Referência	2,08	3,45 \pm 0,46	1,95 \pm 0,48	1,66 \pm 0,220	2,78 \pm 0,97	3,76 \pm 0,51
	Risco	3,78	–	–	–	2,16 \pm 0,36	1,57 \pm 0,27

Os valores são médias \pm erro padrão. MOE: matéria orgânica extraída em $\mu\text{g}/\text{m}^3$. +S9 presença de fração S9 mix; –: indica respostas negativas NT: não testado. Controle negativo (DMSO-5 μl): 34 \pm 14,5 rev/placa (TA98), 44 \pm 18,8 rev/placa (TA98+S9), 49 \pm 21,4 (YG1021), 30 \pm 9,3 (YG1024); Controle positivo: 4NQO (0,5 μg): 856 \pm 503 rev/placa (TA98); 2AF (1 μg): 328 \pm 149 rev/placa (TA98+S9). 2NF (0,15 μg): 6119 \pm 2544 rev/placa (YG1021); 3448 \pm 1268 (YG1024). Os valores dos controles são médias \pm desvio padrão.

As avaliações do efeito mutagênico do material particulado fino (PM_{2,5}) são escassas e recentes no Rio Grande do Sul (Lemos et al., 2012). Comparado com estudos anteriores, os valores ora obtidos ficam na mesma ordem de grandeza daqueles observados no município de Rio Grande, com forte influência urbana e industrial (fertilizantes, alimentos, petroquímica, entre outras atividades) e no mesmo período de amostragem (Lemos et al., 2009). No entanto, valores bem mais elevados de efeito mutagênico foram observados para Porto Alegre (capital do Rio Grande do Sul), alcançando valores superiores a 25 rev/m³ para linhagem TA98 (Vargas et al., 2011).

A relação entre a concentração de partículas e o efeito mutagênico nem sempre é direta. Diversos estudos já demonstraram que somente a avaliação da concentração de partículas no ambiente não é suficiente para assegurar a qualidade do ar (Claxton et al., 2004; Coronas et al., 2008; Coronas et al., 2009; Käffer et al., 2012; Lemos et al., 2012; Pereira et al., 2010; Traversi et al., 2011; Vargas, 2003; Vargas et al. 2011). Neste estudo, no primeiro período de amostragem, maio e junho mostram as maiores e menores respostas para atividade mutagênica, respectivamente, nas duas áreas avaliadas coincidindo com a concentração média de partículas de PM_{2,5}. No entanto, no segundo período essa relação direta de partículas e mutagenicidade não fica tão evidente, como observado para amostra de dezembro da área de risco com a maior concentração de PM_{2,5} observada (35,5µg/m³) e efeito mutagênico baixo e até não observado para TA98+S9. Esses resultados reforçam que o efeito mutagênico associado ao material particulado atmosférico está mais relacionado aos compostos presentes na mistura do que na quantidade de partículas (Vargas, 2003; Claxton et al., 2004).

Assim, a avaliação de compostos de conhecido efeito nocivo pode contribuir para o diagnóstico ambiental. A quantificação de 16 HPAs foram realizadas nos extratos orgânicos de PM_{2,5}. Desses HPAs, oito são classificadas pela Agência Internacional para Pesquisa

sobre Câncer (IARC) como possivelmente, provavelmente ou cancerígenos para os seres humanos (IARC, 2010). Os HPAs com potencial carcinogênico representavam mais de 70% da concentração total nos extratos de agosto nas duas áreas estudadas (Figura 4). As maiores concentrações de HPAs foram observadas na área de risco em todas as amostras avaliadas (Figura 4).

Benzo (b) flouranteno, indeno (1,2,3-cd) pireno e benzo (g, h, i) perileno mostraram as concentrações mais elevadas do que os demais HPAs nas duas áreas estudadas (Figura 5). Estes três HPAs também foram os mais abundantes em outros estudos no Brasil que avaliaram áreas urbanas, rurais e industriais. Benzo(b)fluranteno alcançou concentrações de $12,8 \text{ ng/m}^3$ na cidade de São Paulo em amostras de PM10 (DeMartinis et al., 2002). Benzo(g,h,i)perileno foi abundante em estudos no Rio Grande do Sul em amostras de PTS (Pereira et al., 2010) e PM10 (Dallarosa et al., 2008; Vargas et al., 2011). O indeno(1,2,3-cd)pireno apresentou a maior concentração entre os HPAs estudados em Montenegro (RS) em PTS (Pereira et al., 2010) e também em Esteio em PM10 (Vargas et al., 2011), ambos locais sob influência de indústria petroquímica.

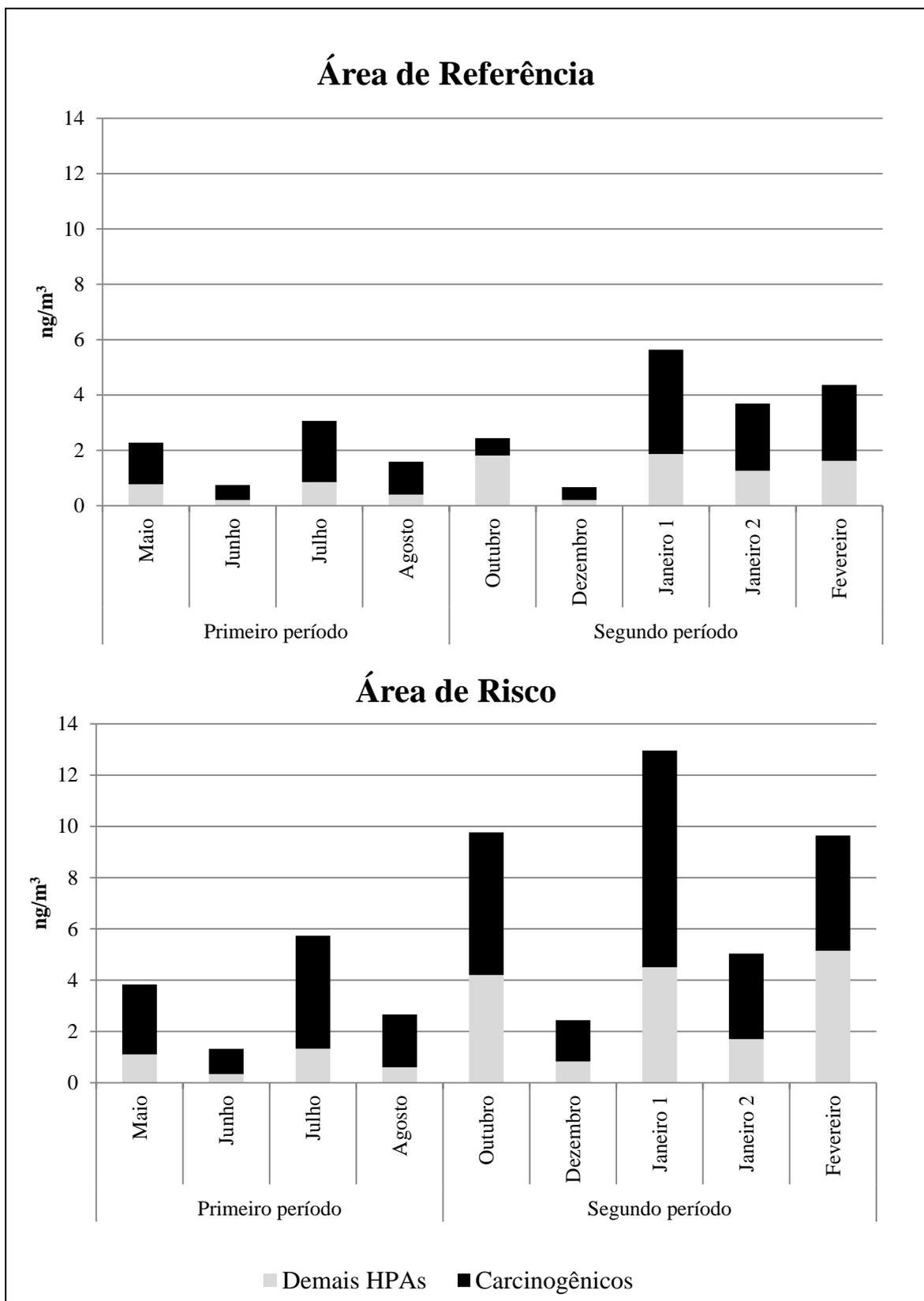


Figura 4 Concentração de HPAs nos extratos orgânicos no material particulado PM_{2,5} na área de referência e de risco da localidade de Barreto, Triunfo, RS. Carcinogênicos são os

classificados pela IARC (2010) no grupo 1, 2A ou 2B (Naph, B[a]A, Chr, B[b]F, B[k]F, B[a]P, I[cd]P and DB[ah]A) . Demais HPAs são Acy, Ace, Fln, Phe, Ant, Flt Pyr e B[ghi]P.

A maior concentração de HPAs no segundo período onde também se observou menores valores ou ausência de efeito mutagênico pode estar relacionada a uma limitação da técnica de extração dos HPAs quando se utiliza um conjunto de filtros. Nesse estudo se usou a técnica de ultrassom para extração dos compostos orgânicos e todos os filtros coletados em um mesmo mês (em torno de quatro) eram colocados em conjunto no banho, o que pode comprometer a eficácia de extração, subestimando as concentrações de HPAs observadas. No presente estudo também se avaliou HPAs e mutagenicidade de extratos de *pools* para outubro de 2009 e janeiro de 2010 (Tabela 1, material suplementar). Essas observações corroboram a hipótese de limitação da eficiência de extração já que no extrato de *pool* está presente o filtro isolado que apresentou concentrações de HPAs mais altas. Resultados similares também foram observados por Pereira (2008). No entanto, para avaliação de mutagenicidade a extração de conjuntos de filtros varia e, em algumas situações, pode aumentar a sensibilidade do teste resultando em maior número ou concentração de compostos de efeito mutagênico.

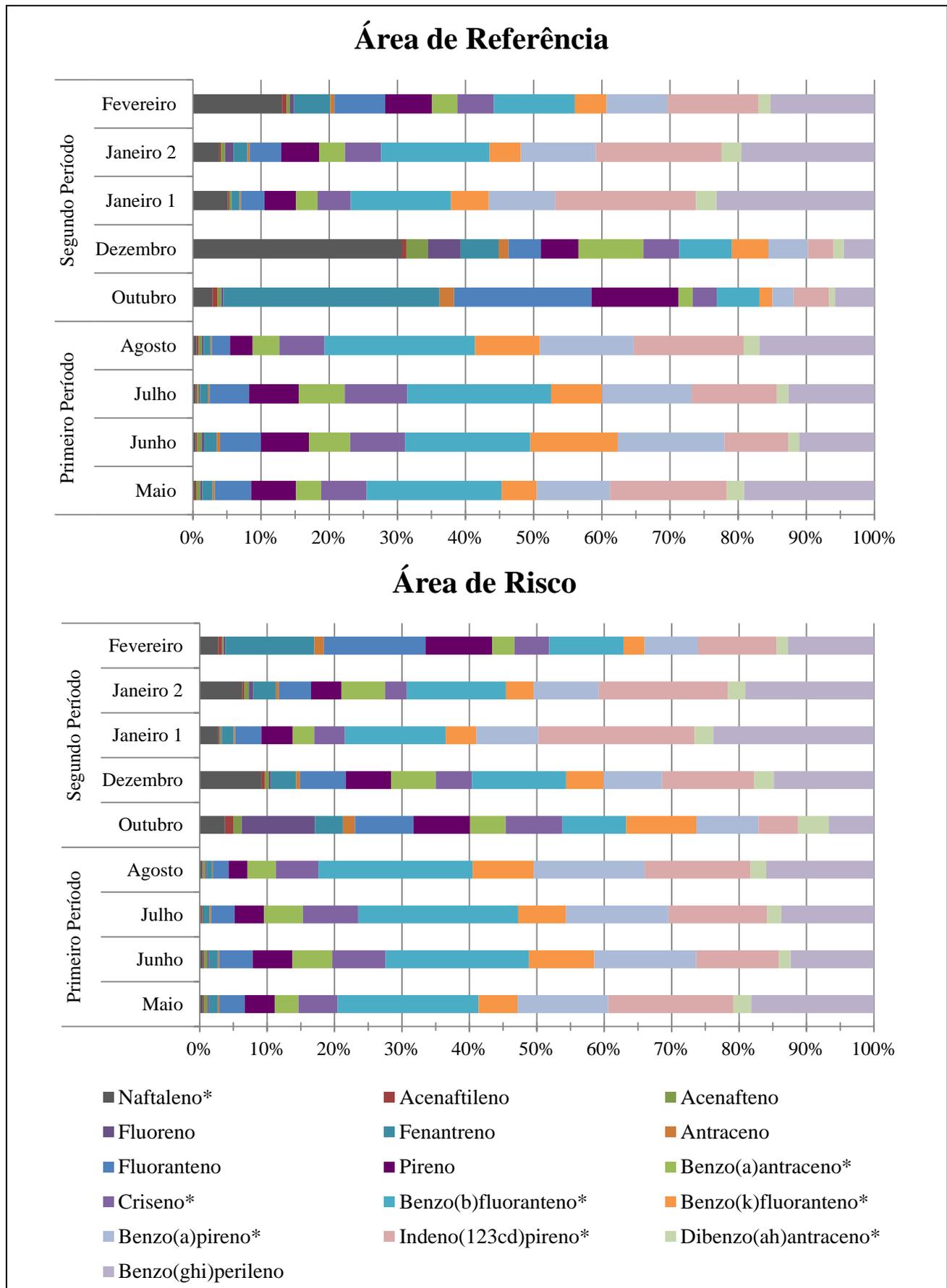


Figura 5 Abundância relativa dos HPAs avaliados nos extratos orgânicos material particulado fino (PM2.5) na área de referência e de risco da localidade de Barreto, Triunfo,RS. * HPAs carcinogênicos segundo classificação da IARC (2010)

3.2 Água destinada ao Abastecimento Público

A avaliação da água destinada ao abastecimento público na localidade de Barreto (Triunfo, RS) mostrou ausência de mutagenicidade em todos os extratos (extração ácida e natural para coletas antes e após o tratamento) frente às linhagens TA98 e TA100, em presença e ausência de metabolização hepática de mamífero *in vitro* (S9 mix). O ponto de captação da água para tratamento está localizado a montante da usina, assim não era esperada influência da contaminação presente na área na qualidade da água. A avaliação da mutagenicidade da água destinada ao abastecimento público buscou identificar outras potenciais fontes de exposição e causadoras de efeitos adversos à população do local.

Estudos anteriores já demonstraram ausência de mutagenicidade em águas superficiais no Rio Grande do Sul em locais com diferentes graus de impacto de atividades humanas, como agricultura e indústrias (Lemos et al., 2009; Pereira et al., 2007). A verificação de mutagenicidade em água superficial não é um evento comum. Um estudo de mais de 20 anos de monitoramento no Estado de São Paulo analisando mais de 1000 amostras verificou presença de mutagenicidade com ensaio *Salmonella*/microsoma em apenas 14% das amostras (Umbuzeiro et al., 2001). A presença de atividade mutagênica em água tratada depende principalmente da qualidade da água bruta, destacando a importância da adequada seleção do ponto de captação (Pereira et al., 2007). Além disso, o controle e prevenção das interferências das atividades humanas nos recursos hídricos são necessários para garantir não apenas a qualidade da água destinada ao abastecimento público, mas também a conservação dos processos ecológicos.

3.3 Biomarcadores genéticos na população

Amostras de sangue e mucosa oral de 42 crianças (21 meninas e 21 meninos) residentes na área adjacente, influenciada pela contaminação oriunda das atividades da usina

de tratamento de madeira (risco) e de 20 residentes (7 meninas e 13 meninos) em área mais afastada (referência) foram coletadas para a investigação de danos genéticos (micronúcleos e danos primários no DNA). A idade das crianças variou entre 5 e 12 anos, sendo 8,5 anos a média dos grupos amostrados. Em alguns marcadores o número de indivíduos foi menor que o total amostrado, pois algumas lâminas ficaram prejudicadas, impossibilitando a análise.

O marcador de dano primário no DNA (*tail intensity*) avaliado pelo ensaio cometa não mostrou valores significativamente diferentes entre o grupo de risco e o de referência (Tabela 2). A frequência de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico foi significativamente maior no grupo de risco (Tabela 2). A frequência de micronúcleos com bloqueio da citocinese em linfócitos de sangue periférico tornou-se um dos biomarcadores mais bem estabelecidos para o estudo de lesões do DNA que ocorrem em seres humanos *in vivo* (Fenech & Bonassi, 2011) e já foi demonstrado que o aumento da frequência de MN em linfócitos de sangue periférico é um biomarcador preditivo do risco de câncer em uma população de indivíduos saudáveis (Bonassi et al., 2006).

A avaliação de micronúcleos, brotos nucleares e demais alterações nucleares em células diferenciadas de mucosa oral é apresentada na Tabela 3. Apenas o número de células binucleadas apresentou aumento significativo em crianças residentes na área próxima a usina de tratamento de madeira. Embora não seja completamente entendido o mecanismo de indução de células binucleadas, é provável que esteja relacionado a falha da citocinese após a última divisão nuclear na camada de células basais (Thomas et al., 2009). Maior frequência de células binucleadas em células de mucosa oral foi também observada em grupos de trabalhadores de mina de carvão a céu aberto (Rohr et al., 2012) e fumicultores (Da Silva et al., 2012).

Tabela 2 Valores médios (média \pm erro padrão) de danos primários no DNA (*tail intensity*) e de micronúcleos (MN) em linfócitos periféricos de crianças residentes na área de risco e de referência em Barreto, Triunfo, RS

Grupos	<i>Referência</i>	<i>Risco</i>
	<i>n=20</i>	<i>n=42</i>
<i>Tail intensity</i>	7,2 \pm 3,15	7,1 \pm 2,16
(intervalo)	(1,04 – 23,86)	(1,09 – 28,89)
	<i>n=17</i>	<i>n=41</i>
MN em 2000 células	0,82 \pm 0,15	1,28 \pm 0,20*
(intervalo)	(0 – 2)	(0 – 4)

* $p < 0,001$. Analisados 100 linfócitos por indivíduo no ensaio cometa e 2000 no ensaio do MN. Diferenças no ensaio cometa foram avaliadas por ANOVA – Modelos Hierárquicos ($F=0,02$; $p=0,89$). Controles negativos e positivos do ensaio cometa, respectivamente: 2,7 \pm 3,4 e 20,1 \pm 9,9 (*tail intensity*).

Tabela 3 Frequência (%) de micronúcleo (MN) e de alterações nucleares em células de mucosa oral de crianças residentes na área de risco e referência em Barreto, Triunfo, RS

Local (números de indivíduos analisados)	Dano no DNA (%)		Alterações nucleares (‰)				
	MN	Brotos nucleares	BN	Pic	CC	Crx	CrI
Referência (n=19)	0,16	0	2,0	1,8	2,3	14,6	4,2
Risco (n=38)	0,14	0,079	3,4*	2,4	3,7	18,6	5,9

* $p < 0,05$ em relação ao grupo de referência. Diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando Modelos Lineares Generalizados com distribuição de Poisson para MN e brotos nucleares e distribuição binomial negativa para alterações nucleares. BN: binucleada, Pic: picnose, CC: cromatina condensada, Crx: cariorréxe, CrI: cariólise.

Na tentativa de minimizar possíveis efeitos de confusão (localização geográfica, estilo e hábitos de vida, etc) que podem interferir nos resultados, a população de referência apresentava as mesmas características da população de risco, apenas com potencial menor de exposição aos contaminantes oriundos do tratamento de madeira. No entanto, além do menor número de indivíduos no grupo de referência, a área não parece estar livre da influência da usina e os indivíduos se deslocavam para a utilização de diversos serviços, inclusive o de saúde, que se localizam na área de risco, próximo à usina.

Ampla variação da frequência de micronúcleos em células da mucosa oral em outros estudos avaliando exposições ambientais foi observada (Holland et al., 2008). Bonassi et al. (2011) avaliaram o potencial efeito de fatores de confusão e estimaram a frequência espontânea de MN em células esfoliadas de mucosa oral em 0,74‰ e encontram uma

tendência de aumento na frequência com a idade, o que pode se esperar frequências menores para crianças, como no caso do presente estudo.

No entanto, os marcadores sensíveis nessa população indicam que os danos observados podem estar relacionados com defeitos no mecanismo de divisão celular. O MN pode ser formado por um cromossomo ou fragmento de cromossomo que não foi incorporado ao núcleo pela ausência ou inadequado reparo de lesões no DNA ou, ainda, por defeitos no fuso mitótico ou na maquinaria de divisão celular. A maior frequência de células binucleadas na mucosa oral observada também indica alterações nos mecanismos de divisão celular (citocinese). Nesse caso, a origem dessas alterações não estaria relacionada com os danos identificados pelo ensaio cometa (como quebras no DNA), que marca danos primários à molécula do DNA.

4. Conclusões

A avaliação da presença de poluentes orgânicos com efeito mutagênico e carcinogênico no material particulado atmosférico fino na localidade avaliada, influenciada pelas atividades de uma usina de tratamento de madeira já desativada, indicou a possibilidade de risco de exposição devido a substâncias presentes e o potencial mutagênico. Embora comum, a presença de mutagenicidade em amostras de material atmosférico, o potencial mutagênico observado e as substâncias avaliadas se assemelham aos resultados de estudos de áreas urbanas e industriais, o que não é o caso da área estudada.

O ensaio do MN com bloqueio da citocinese em linfócitos de sangue periférico foi um biomarcador sensível para apontar diferença entre as crianças residentes próximas a usina em relação as da área de referência. Apesar da ausência de diferenças entre os grupos nos outros biomarcadores de genotoxicidade avaliados, o conjunto de dados do presente

estudo indica que a população está potencialmente exposta a substâncias capazes de causar efeitos adversos à saúde, sendo a via atmosférica uma possível rota de exposição.

Estudos futuros que permitam a comparação com um grupo de crianças saudáveis, com o mesmo perfil, mas afastadas de influências urbanas, industriais e de outros contaminantes pode fornecer melhores subsídios para avaliação dos resultados observados. Ainda, a identificação do MN por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda centromérica para identificar o conteúdo cêntrico ou acêntrico dos MN, diferenciado fragmentos cromossômicos e cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal, poderá contribuir na avaliação e interpretação dos resultados.

As pesquisas devem avançar na busca de padronização desses biomarcadores e em valores de referência. Desse modo, esses ensaios de avaliação de efeito precoce podem ter maior aplicabilidade em estudos, monitoramento e diagnóstico ambiental e na avaliação de exposição, contribuindo para aplicação e ampliação de medidas preventivas ou de controle, promovendo a qualidade do ecossistema e de vida da população humana.

Agradecimentos

As autoras agradecem a todos os voluntários, a equipe do Posto de Saúde de Barreto pela coleta do material biológico e atmosférico e a Ieda Osório da equipe de amostragem da FEPAM. A pesquisa teve apoio financeiro do CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, processos n^{os} 573993/2008-4 (INAGEMP) e 555187/2006-3 (EcoRISCO-SAÚDE). A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) concedeu Bolsa de Doutorado a M. V. Coronas.

Referências

- Bhattacharya, P., Mukherjee, A.B., Jacks, G., Nordqvist, S., 2002. Metal contamination at a wood preservation site: characterisation and experimental studies on remediation. *Sci. Total Environ* 290, 165–180.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M., 2006. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28, 625–631.
- Bonassi, S., Coskun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S., Holland, N., Kirsh-Volders, M., Knasmueller, S., Zeiger, E., Carnesoltas, D., Cavallo, D., da Silva, J., de Andrade, V.M., Demircigil, G.C., Odio, A.D., Donmez-Altuntas, H., Gattas, G., Giri, A., Giri, S., Gómez-Meda, B., Gómez-Arroyo, S., Hadjidekova, V., Haveric, A., Kamboj, M., Kurteshi, K., Martino-Roth, M.G., Montoya, R.M., Nersesyan, A., Pastor-Benito, S., Salvadori, D.M.F., Shaposhnikova, A., Stopper, H., Thomas, P., Torres-Bugarín, O., Yadav, A.S., González, G.Z., Fenech, M., 2011. The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat. Res.* 728, 88–97.
- Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA n 003. Padrões Nacionais de Qualidade do Ar. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília. 28 June 1990. 15937–15939.
- Cardozo, T.R., Rosa, D.P., Feiden, I.R., Rocha, J.A.V., de Oliveira, N.C.D., da Silva Pereira, T., Pastoriza, T.F., da Motta Marques, D., de Lemos, C.T., Terra, N.R., Vargas,

- V.M.F., 2006. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. *Mutat. Res.* 603, 83–96.
- Claxton, L.D., Matthews, P.P., Warren, S.H., 2004. The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: *Salmonella* mutagenicity. *Mutat. Res.* 567, 347–399.
- Claxton, L.D., Woodall Jr., G.M., 2007. A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. *Mutat. Res.* 636, 36–94.
- Coronas, M.V., Horn, R.C., Ducatti, A., Rocha, J.V., Vargas, V.M.F., 2008. Mutagenic activity of airborne particulate matter in a petrochemical industrial area. *Mutat. Res.* 650, 196–201.
- Coronas, M.V., Pereira, T.S., Rocha, J.A.V., Lemos, A.T., Fachel, J.M.G., Salvadori, D.M.F., Vargas, V.M.F., 2009. Genetic biomonitoring of an urban population exposed to mutagenic airborne pollutants. *Environ. Int.* 35, 1023–1029.
- Coronas MV, Bavaresco J, Rocha JAV, Geller AM, Caramão EB, Rodrigues MLK, Vargas VMF. Attic dust assessment near a wood treatment plant: past air pollution and potential exposure. *Arch Environ Contam Toxicol* 2012, submetido.
- da Costa, T.C., de 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., 2012. Runoff of genotoxic compounds in river basin sediment under the influence of contaminated soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 75, 63–72.
- Dahlgren, J., Takhar, H., Schecter, A., Schmidt, R., Horsak, R., Paepke, O., Warshaw, R., Lee, A., Anderson-Mahoney, P., 2007. Residential and biological exposure assessment of chemicals from a wood treatment plant. *Chemosphere* 67, S279–S285.
- Dahlgren, J., Warshaw, R., Horsak, R.D., Parker III, F.M., Takhar, H., 2003. Exposure assessment of residents living near a wood treatment plant. *Environ. Res.* 92, 99–109.

- Dallarosa, J., Calessio Teixeira, E., Meira, L., Wiegand, F., 2008. Study of the chemical elements and polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particles of PM10 and PM2.5 in the urban and rural areas of South Brazil. *Atmos. Res.*89, 76–92.
- Da Silva, F.R., Da Silva, J., Allgayer, M. da C., Simon, C.F., Dias, J.F., dos Santos, C.E.I., Salvador, M., Branco, C., Schneider, N.B., Kahl, V., Rohr, P., Kvitko, K., 2012. Genotoxic biomonitoring of tobacco farmers: Biomarkers of exposure, of early biological effects and of susceptibility. *J. Hazard. Mater.* 225–226, 81–90.
- De Martinis, B.S., Okamoto, R.A., Kado, N.Y., Gundel, L.A., Carvalho, L.R.F., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons in a bioassay-fractionated extract of PM10 collected in São Paulo, Brazil. *Atmos. Environ.*36, 307–314.
- Ducatti, A., Vargas, V.M.F., 2003. Mutagenic activity of airborne particulate matter as an indicative measure of atmospheric pollution. *Mutat. Res.* 540, 67–77.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455, 81–95.
- Fenech, M., Bonassi, S., 2011. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 26, 43–49.
- Feng, L., Wu, C., Sutherland, A.J., Clark, J.J., Rosenfeld, P.E., 2011. Dioxin furan blood lipid and attic dust concentrations in populations living near four wood treatment facilities in the United States. *J. Environ. Health* 73, 34–46.
- Gallego, E., Roca, F.J., Perales, J.F., Guardino, X., Berenguer, M.J., 2008. VOCs and PAHs emissions from creosote-treated wood in a field storage area. *Sci. Total Environ* 402, 130–138.
- Hensley, A.R., Scott, A., Rosenfeld, P.E., Clark, J.J.J., 2007. Attic dust and human blood samples collected near a former wood treatment facility. *Environ. Res.*105, 194–199.

- Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., Fenech, M., 2008. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat. Res.* 659, 93–108.
- Holland, N., Fucic, A., Merlo, D.F., Sram, R., Kirsch-Volders, M., 2011. Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. *Mutagenesis* 26, 51–56.
- IARC International Agency for Research on Cancer (2010) Agents Classified by the IARC Monographs Volumes 1–102, IARC: Lyon, France.
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>
- Kado, N.Y., Guirguis, G.N., Flessel, C.P., Chan, R.C., Chang, K.-I., Wesolowski, J.J., 1986. Mutagenicity of fine (< 2.5 µm) airborne particles: Diurnal variation in community air determined by a salmonella micro preincubation (microsuspension) procedure. *Environ. Mutagen.* 8, 53–66.
- Käffer, M.I., Lemos, A.T., Apel, M.A., Rocha, J.V., Martins, S.M. de A., Vargas, V.M.F., 2012. Use of bioindicators to evaluate air quality and genotoxic compounds in an urban environment in Southern Brazil. *Environ. Poll.* 163, 24–31.
- Kassie, F., Parzefall, W., Knasmüller, S., 2000. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 463, 13–31.
- Lemos, A.T., Coronas, M.V., Rocha, J.A.V., Vargas, V.M.F., 2012. Mutagenicity of particulate matter fractions in areas under the impact of urban and industrial activities. *Chemosphere* 89, 1126–1134.
- Lemos, A.T., Rosa, D.P., Rocha, J.A.V., Vargas, V.M.F., 2009. Mutagenicity assessment in a river basin influenced by agricultural, urban and industrial sources. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 2058–2065.

- Lewtas, J., 2007. Air pollution combustion emissions: Characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutat. Res.*636, 95–133.
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat.Res.*113, 173–215.
- Neri, M., Bonassi, S., Knudsen, L., Sram, R., Holland, N., Ugolini, D., Merlo, D., 2006a. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damageI. Overview and critical issues. *Mutat.Res.*612, 1–13.
- Neri, M., Ugolini, D., Bonassi, S., Fucic, A., Holland, N., Knudsen, L., Sram, R., Ceppi, M., Bocchini, V., Merlo, D., 2006b. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damageII. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutat.Res.*612, 14–39.
- OMS – Organização Mundial de Saúde Air Quality Guidelines for Particulate Matter, Ozone, Nitrogen Dioxide and Sulfur Dioxide. Global Update, Geneva, 2005
- Pereira, T. S.. Biomonitoramento das populações humanas através de avaliação de genotoxicidade em áreas sujeitas a risco ecotoxicológico. Porto Alegre: UFRGS, 2008. 179 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/17051>
- Pereira, T. da S., Rocha, J.A.V., Duccatti, A., Silveira, G.A., Pastoriza, T.F., Bringuenti, L., Vargas, V.M.F., 2007. Evaluation of mutagenic activity in supply water at three sites in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mutat.Res.*629, 71–80.
- Pereira, T.S., Gotor, G.N., Beltrami, L.S., Nolla, C.G., Rocha, J.A.V., Broto, F.P., Comellas, L.R., Vargas, V.M.F., 2010. Salmonella mutagenicity assessment of airborne particulate matter collected from urban areas of Rio Grande do Sul State, Brazil, differing in

- anthropogenic influences and polycyclic aromatic hydrocarbon levels. *Mutat.Res.*702, 78–85.
- Pereira Netto, A.D., Moreira, J.C., Dias, A.E.X.O., Arbilla, G., Ferreira, L.F.V., Oliveira, A.S., Barek, J., 2000. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. *Quím. Nova* 23, 765–773.
- Pohl, H., Abadin, H., 2008. Chemical mixtures: Evaluation of risk for child-specific exposures in a multi-stressor environment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*233, 116–125.
- Pohren, R. de S., Rocha, J.A.V., Leal, K.A., Vargas, V.M.F., 2012. Soil mutagenicity as a strategy to evaluate environmental and health risks in a contaminated area. *Environ.Int.*44, 40–52.
- Ryan, P.B., Burke, T.A., Cohen Hubal, E.A., Cura, J.J., McKone, T.E., 2007. Using Biomarkers to Inform Cumulative Risk Assessment. *Environ. Health Perspect.* 115, 833–840.
- Salvadori, D. M. F.; Ribeiro, L. R.; Fenech, M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro, in: Ribeiro, L. R., Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. (Orgs.) *Mutagênese ambiental*. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. 356p.
- Salvi, S., 2007. Health effects of ambient air pollution in children. *Paediatr. Respir. Rev.* 8, 275–280.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Speit, G., Hartmann, A., 1999. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test): A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair, in: *DNA Repair Protocols*. Humana Press, New Jersey, pp. 203–212.

- Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., Fenech, M., 2009. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 4, 825–837.
- Tolbert, P.E., Shy, C.M., Allen, J.W., 1992. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat.Res.and Related Subjects* 271, 69–77.
- Traversi, D., Schilirò, T., Degan, R., Pignata, C., Alessandria, L., Gilli, G., 2011. Involvement of nitro-compounds in the mutagenicity of urban Pm2.5 and Pm10 in Turin. *Mutat.Res.*726, 54–59.
- Umbuzeiro, G. de A., Roubicek, D.A., Sanchez, P.S., Sato, M.I.Z., 2001. The Salmonella mutagenicity assay in a surface water quality monitoring program based on a 20-year survey. *Mutat.Res.*491, 119–126.
- Valverde, M., Rojas, E., 2009. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutat.Res.*681, 93–109.
- Vargas, V.M.F., 2003. Mutagenic activity as a parameter to assess ambient air quality for protection of the environment and human health. *Mutat.Res.* 544, 313–319.
- Vargas, V.M., De Brito, K.C.T., Coronas, M.V., 2011. Genetic Biomarkers Applied to Environmental Air Quality: Ecological and Human Health Aspects, in: Mazzeo, N. (Ed.), *Air Quality Monitoring, Assessment and Management*. InTech.
- Vargas, V.M.F., Horn, R.C., Guidobono, R.R., Mittelstaedt, A.B., Azevedo, I.G. de, 1998. Mutagenic activity of airborne particulate matter from the urban area of Porto Alegre, Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 21, 247–253.
- Watanabe, M., Ishidate Jr., M., Nohmi, T., 1989. A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. *Muta.Res.*216, 211–220.

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

Material Suplementar

Tabela 1 Concentração de partículas, matéria orgânica extraída (MOE), concentração de HPAs e mutagenicidade na linhagem TA98 de *S. typhimurium* em extratos orgânicos de filtros em conjunto (*pool*) e isolados de PM_{2,5} nas áreas de risco (sob influência de contaminantes da atividade de preservação de madeira) e área de referência no distrito de Barreto, município de Triunfo, RS.

	Outubro - <i>pool</i>		Outubro - isolado		Janeiro - <i>pool</i>		Janeiro 1 - isolado		Janeiro 2 - isolado	
	Referência	Risco	Referência	Risco	Referência	Risco	Referência	Risco	Referência	Risco
PM _{2,5}	10,28	30,56	33,26	25,14	6,26	6,03	19,96	8,63	3,87	1,25
($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	22,49	21,88			19,96	8,63				
	33,26	25,14			6,61	5,81				
					3,87	1,25				
MOE	0,47	1,62	1,42	2,62	0,53	0,7	1,41	1,79	1,37	0,51
($\mu\text{g}/\text{m}^3$)										
HPAs Totais	6,11	6,88	2,44	9,77	0,80	4,32	5,64	12,96	3,69	5,04
(ng/m^3)										
HPAs	4,22	4,76	0,63	5,56	0,48	2,86	3,77	8,45	2,43	8,45
Carcinogênicos ^a										
(ng/m^3)										
TA98	3,24 ± 0,37	6,03 ± 0,66	6,42 ± 0,78	3,12 ± 0,60	0,80 ± 0,10	1,44 ± 0,22	2,33 ± 0,36	7,66 ± 1,37	1,78 ± 0,37	-
(rev/m^3)										
TA98+S9	2,31 ± 0,35	4,75 ± 0,32	NT	3,98 ± 0,62	-	0,39 ± 0,06	-	-	-	-
(rev/m^3)										

^a HPAs carcinogênicos segundo classificação da IARC (2010)

Os valores são médias ± erro padrão. +S9 presença de fração S9 mix; -: indica respostas negativas NT: não testado. Controle negativo (DMSO-5 μ l): 34±14,5 rev/placa (TA98), 44±18,8 rev/placa (TA98+S9), Controle positivo: 4NQO (0,5 μ g): 856 ± 503 rev/placa (TA98); 2AF (1 μ g): 328±149 rev/placa (TA98+S9).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação de misturas complexas e o potencial risco e efeito dessas misturas para o ambiente e população continua um grande desafio para pesquisa e uma necessidade para adoção de medidas preventivas e de intervenção na busca para assegurar o bem-estar da população. Nesse contexto, marcadores de efeito precoce podem ser uma alternativa para monitoramento e diagnóstico ambiental de misturas complexas. A identificação do efeito biológico permite estimar a ação da mistura tanto no ambiente, onde ocorrem reações que transformam os compostos, tornando-os mais ou menos ativos, quanto nas moléculas biológicas onde as substâncias também passam por processos de transformação nos organismos.

As atividades humanas para produção de bens e serviços utilizam e transformam substâncias que, de uma maneira ou outra, acabam chegando ao ambiente. Apesar do avanço no conhecimento toxicológico das substâncias e de tecnologias capazes de diminuir o impacto dos processos, muitas atividades deixaram passivos de contaminação ambiental em épocas em que não se tinha o devido conhecimento e controle. Entre os processos de grande utilidade, está a preservação de madeira, pois além do aumento da vida útil desse recurso, garante a diminuição da pressão sobre as florestas nativas. No Brasil desde 1965 é obrigatório o uso de madeiras preservadas nos serviços de utilidade pública como transporte, energia elétrica, etc (Brasil, 1965). No entanto, esse processo de tratamento envolve a utilização de produtos químicos, na sua grande maioria, altamente tóxicos e que podem causar danos à saúde dos trabalhadores e ao meio ambiente, e por fim, podem comprometer a saúde da população que vive no entorno dessas áreas. Diversas populações de áreas onde ocorrem ou ocorreram essa atividade sofrem seus os efeitos adversos (Dahlgren et al. 2003a, Dahlgren et al. 2003b; Dahlgren et al. 2007; Hensley et al. 2007; Karouna-Renier et al.

2007; Feng et al. 2011) Na área investigada ficou evidente, pela análise da poeira de sótão, que as emissões passadas alcançavam as residências da população do entorno da usina, indicando a exposição e risco não apenas para os trabalhadores. No entanto, o objetivo do presente estudo era avaliar se a presença dos compostos na área continua oferecendo riscos e comprometendo a qualidade ambiental.

A investigação de biomarcadores de efeito genotóxico precoce em crianças, no contexto deste estudo, apresenta diversas vantagens. Além da maior sensibilidade de crianças frente a exposição de substâncias químicas (Neri et al., 2006a; Neri et al., 2006b), esse tipo de abordagem diminui diversos fatores de confusão como a exposição ocupacional (esse núcleo populacional se formou em razão do estabelecimento da usina), hábitos de vida como fumo e consumo de bebidas alcoólicas e, tempo maior de permanência na localidade uma vez que são oferecidos serviços de educação e saúde, já que os adultos, em muitos casos, trabalham em outros locais mais afastados.

A avaliação de amostras de material particulado fino (PM_{2,5}), da água de abastecimento e da poeira de sótão das residências do entorno da usina foi utilizada para caracterização e diagnóstico ambiental das possíveis rotas de exposição dos contaminantes oriundos da atividade de preservação de madeira. A água destinada ao abastecimento público apresentou ausência de atividade mutagênica no ensaio *Salmonella*/microsoma. No entanto, o potencial mutagênico da poeira de sótão foi bem elevado nas residências do entorno da usina. A análise conjunta dos dados químicos e dos ensaios biológicos demonstrou que a poeira do sótão é uma matriz estável e representativa da emissão histórica, mostrando a diminuição da concentração dos poluentes com o aumento da distância em relação a fonte poluidora. Apesar de ter sido observada relação entre a atividade mutagênica dessa matriz com as concentrações de HPAs, a mutagenicidade foi muito maior do que o

esperado para a soma das potências mutagênicas de cada HPA, indicando a presença de outros compostos e/ou efeitos sinérgicos que potencializam o efeito da mistura.

Na avaliação da fração orgânica do material particulado fino (PM_{2,5}) não foi observada relação direta entre a concentração de HPAs e potencial mutagênico. Amostras que apresentaram as maiores concentrações de HPAs tiveram respostas negativas para mutagenicidade em ensaios em presença de fração de metabolização de mamífero *in vitro* (S9 mix). A observação desse resultado, em desacordo com o esperado, destacou a possibilidade de ocorrer redução da eficiência de extração de HPAs quando se agrupam vários filtros. A partir disso, a verificação dessa possível limitação da técnica torna-se necessária para o ajuste da metodologia a fim de não ocorrer subestimativas da presença desses compostos no ambiente.

A investigação da mutagenicidade na fração fina (PM_{2,5}) é ainda escassa no Brasil e no Rio Grande do Sul (Lemos et al., 2012). Os resultados do presente estudo contribuem para caracterização e riscos associados a essa fração, ressaltando a necessidade de adoção de medidas de prevenção e controle para esse poluente, no qual não existe regulamentação para parâmetros e índices de qualidade no Brasil (Brasil, 1990).

Por fim, o conjunto dos dados obtidos no presente estudo de biomonitoramento e marcadores ambientais indicam que a população está potencialmente exposta a substâncias capazes de causar efeitos adversos a saúde, sendo a via atmosférica uma possível rota de exposição. Os danos observados indicam defeitos no mecanismo de divisão celular, uma vez que a origem do MN pode estar relacionada com defeitos no fuso mitótico ou na maquinaria de divisão celular e a maior frequência de células binucleadas na mucosa oral observada também sugere a presença de alterações nos mecanismos de divisão celular (citocinese). A identificação do MN por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda centromérica

para identificar o conteúdo cêntrico ou acêntrico dos MN, diferenciado fragmentos cromossômicos e cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal, poderá contribuir na avaliação e interpretação dos resultados.

A necessidade de uma avaliação mais cautelosa dos biomarcadores individualmente e da avaliação de um grupo de referência menos suscetível às influências da área contaminada também foi destacada. As pesquisas devem avançar na busca de padronização dos protocolos desses biomarcadores e em valores de referência. Desse modo, esses ensaios de avaliação de efeito precoce podem ter maior aplicabilidade em estudos, monitoramento e diagnóstico ambiental e na avaliação de exposição.

Ensaio biológico são ferramentas sensíveis para examinar a presença de classes de compostos químicos com efeito mutagênico e carcinogênico em programas de monitoramento ambiental para caracterização de áreas sob a influência de atividades antrópicas. No estado do Rio Grande do Sul os ensaios genotóxicos, especialmente *Salmonella*/ microssoma, já são utilizados no controle de efluentes industriais (Rio Grande do Sul, 2006), representando um grande avanço na legislação ambiental brasileira. As diversas possibilidades de avaliação nas diferentes matrizes permite a possibilidade de utilização desse ensaio para monitoramento e diagnóstico dos diferentes compartimentos ambientais, ampliando o controle sobre as atividades humanas e aprofundando o diagnóstico ambiental diante da complexidade de composição e reações das substâncias no ambiente. Os biomarcadores na população, nessa abordagem, podem servir de evidência para os efeitos biológicos dessas substâncias, embasando a necessidade de medidas preventivas, e, assim, promovendo a saúde do ecossistema e a qualidade de vida da população humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease), 1995 Registry Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). US Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.html>.
- BRASIL, 1965. Lei nº 4.797, de 20 de outubro de 1965.
- BRASIL, 1990. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA n 003. Padrões Nacionais de Qualidade do Ar. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília. 28 Junho 1990. 15937–15939.
- BRASIL, 2006. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa nº 132, de 10 de novembro de 2006 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis IBAMA, Brasília, Brasil, 2006;
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulka-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M., 2006. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28, 625–631.
- Calderón-Garcidueñas, L., Wen-Wang, L., Zhang, Y.J., Rodriguez-Alcaraz, A., Osnaya, N., Villarreal-Calderón, A., Santella, R.M., 1999. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion, and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution. *Environment International* 106, 469–474.

- Cardozo, T.R., Rosa, D.P., Feiden, I.R., Rocha, J.A.V., De Oliveira, N.C.D., Da Silva Pereira, T., Pastoriza, T.F., Da Motta Marques, D., De Lemos, C.T., Terra, N.R., Vargas, V.M.F., 2006. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. *Mutation Research* 603, 83–96.
- Claxton, L.D., Matthews, P.P., Warren, S.H., 2004. The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity. *Mutation Research* 567, 347–399.
- Claxton, L.D., Woodall Jr., G.M., 2007. A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. *Mutation Research* 636, 36–94.
- Coronas, M.V., Horn, R.C., Ducatti, A., Rocha, J.V., Vargas, V.M.F., 2008. Mutagenic activity of airborne particulate matter in a petrochemical industrial area. *Mutation Research* 650, 196–201.
- Coronas, M.V., Pereira, T.S., Rocha, J.A.V., Lemos, A.T., Fachel, J.M.G., Salvadori, D.M.F., Vargas, V.M.F., 2009. Genetic biomonitoring of an urban population exposed to mutagenic airborne pollutants. *Environment International* 35, 1023–1029.
- da Costa, T.C., De 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., 2012. Runoff of genotoxic compounds in river basin sediment under the influence of contaminated soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 75, 63–72.
- Dahlgren, J., Warshaw, R., Thornton, J., Anderson-Mahoney, P., Takhar, H., 2003a. Health effects on nearby residents of a wood treatment plant, *Environmental Research* 92, 92–98.
- Dahlgren, J., Warshaw, R., Horsak, R.D., Parker III, F.M., Takhar, H., 2003b. Exposure assessment of residents living near a wood treatment plant. *Environmental Research* 92, 99–109.

- De Martinis, B.S., Y. Kado, N., De Carvalho, L.R., Okamoto, R.A., Gundel, L.A., 1999. Genotoxicity of fractionated organic material in airborne particles from São Paulo, Brazil. *Mutation Research* 446, 83–94.
- Ducatti, A., Vargas, V.M.F., 2003. Mutagenic activity of airborne particulate matter as an indicative measure of atmospheric pollution. *Mutation Research* 540, 67–77.
- Fenech, M., Holland, N., Zeiger, E., Chang, W.P., Burgaz, S., Thomas, P., Bolognesi, C., Knasmueller, S., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., 2011. The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells--past, present and future. *Mutagenesis* 26, 239–245.
- FEPAM Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler (2010) Qualidade das águas da bacia hidrográfica do rio das Antas e do rio Taquari <http://www.fepam.rs.gov.br>
- FEPAM Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler (2010) Estratégias ecotoxicológicas para caracterizar áreas contaminadas como medida de risco à saúde de populacional. Vargas, V.M.F. (coord.)
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 455, 81–95.
- Fenech, M., Bonassi, S., 2011. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 26, 43–49.
- Feng, L., Wu, C., Sutherland, A.J., Clark, J.J., Rosenfeld, P.E., 2011. Dioxin furan blood lipid and attic dust concentrations in populations living near four wood treatment facilities in the United States. *Journal of Environmental Health* 73, 34–46.

- Gallego, E., Roca, F.J., Perales, J.F., Guardino, X., Berenguer, M.J., 2008. VOCs and PAHs emissions from creosote-treated wood in a field storage area. *Science of The Total Environment* 402, 130–138.
- Hensley, A.R., Scott, A., Rosenfeld, P.E., Clark, J.J.J., 2007. Attic dust and human blood samples collected near a former wood treatment facility. *Environmental Research* 105, 194–199.
- Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., Fenech, M., 2008. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research* 659, 93–108.
- Huen, K., Gunn, L., Duramad, P., Jeng, M., Scalf, R., Holland, N., 2006. Application of a geographic information system to explore associations between air pollution and micronucleus frequencies in African American children and adults. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47, 236–246.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 2010. Agents Classified by the IARC Monographs Volumes 1–102, IARC: Lyon, France. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>
- Kado, N.Y., Guirguis, G.N., Flessel, C.P., Chan, R.C., Chang, K.-I., Wesolowski, J.J., 1986. Mutagenicity of fine (< 2.5 µm) airborne particles: Diurnal variation in community air determined by a salmonella micro preincubation (microsuspension) procedure. *Environmental Mutagenesis* 8, 53–66.
- Karouna-Renier, N.K., Rao, K.R., Lanza, J.J., Davis, D.A., Wilson, P.A., 2007. Serum profiles of PCDDs and PCDFs, in individuals near the Escambia Wood Treating Company Superfund site in Pensacola, FL. *Chemosphere* 69, 1312–1319.

- Kassie, F., Parzefall, W., Knasmüller, S., 2000. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research* 463, 13–31.
- Lemos, A.T., Coronas, M.V., Rocha, J.A.V., Vargas, V.M.F., 2012. Mutagenicity of particulate matter fractions in areas under the impact of urban and industrial activities. *Chemosphere* 89, 1126–1134.
- Lopes, W. A., Andrade, J. B., 1996. Fontes, Formação, Reatividade e Quantificação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) na Atmosfera *Química Nova* 19, 497-516
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research* 113, 173–215.
- Marvin, C.H., Hewitt, L.M., 2007. Analytical methods in bioassay-directed investigations of mutagenicity of air particulate material. *Mutation Research* 636, 4–35.
- Mielzynska, D., 2006. The influence of environmental exposure to complex mixtures including PAHs and lead on genotoxic effects in children living in Upper Silesia, Poland. *Mutagenesis* 21, 295–304.
- Milošević-Djordjević, O., Grujić, D., Arsenijević, S., Marinković, D., 2005. Monitoring of Lymphocyte Micronuclei among Newborns from Kragujevac in Central Serbia before and after Environmental Contamination. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 205, 1–9.
- National Research Council., 1987. Biological markers in environmental health research. Committee on Biological Markers of the National Research Council. *Environmental Health Perspectives* 74, 3–9.

- Neri, M., Bonassi, S., Knudsen, L., Sram, R., Holland, N., Ugolini, D., Merlo, D., 2006a. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damageI. Overview and critical issues. *Mutation Research* 612, 1–13.
- Neri, M., Ugolini, D., Bonassi, S., Fucic, A., Holland, N., Knudsen, L., Sram, R., Ceppi, M., Bocchini, V., Merlo, D., 2006b. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damageII. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutation Research* 612, 14–39.
- Pereira, T. da S., Rocha, J.A.V., Duccatti, A., Silveira, G.A., Pastoriza, T.F., Bringuenti, L., Vargas, V.M.F., 2007. Evaluation of mutagenic activity in supply water at three sites in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mutation Research* 629, 71–80.
- Pereira, T.S., Gotor, G.N., Beltrami, L.S., Nolla, C.G., Rocha, J.A.V., Broto, F.P., Comellas, L.R., Vargas, V.M.F., 2010. Salmonella mutagenicity assessment of airborne particulate matter collected from urban areas of Rio Grande do Sul State, Brazil, differing in anthropogenic influences and polycyclic aromatic hydrocarbon levels. *Mutation Research* 702, 78–85.
- Pohl, H., Abadin, H., 2008. Chemical mixtures: Evaluation of risk for child-specific exposures in a multi-stressor environment. *Toxicology and Applied Pharmacology* 233, 116–125.
- Pohren, R. de S., Rocha, J.A.V., Leal, K.A., Vargas, V.M.F., 2012. Soil mutagenicity as a strategy to evaluate environmental and health risks in a contaminated area. *Environment International* 44, 40–52.
- Rio Grande do Sul, 2006. Conselho Estadual do Meio Ambiente. Resolução CONSEMA N°129/2006. (6 Fevereiro 2007). Dispõe sobre a definição de critérios e padrões de

emissão para toxicidade de efluentes líquidos lançados em águas superficiais do Estado do Rio Grande do Sul. Disponível em <<http://www.sema.rs.gov.br>>.

Ryan, P.B., Burke, T.A., Cohen Hubal, E.A., Cura, J.J., McKone, T.E., 2007. Using Biomarkers to Inform Cumulative Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives* 115, 833–840.

Salvadori, D. M. F.; Ribeiro, L. R.; Fenech, M., 2003. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. in: Ribeiro, L. R., Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. (Orgs.) *Mutagênese ambiental*. Canoas: Ed. ULBRA, pp. 201-223.

Salvi, S., 2007. Health effects of ambient air pollution in children. *Paediatric Respiratory Reviews* 8, 275–280.

Silins, I., Högberg, J., 2011. Combined Toxic Exposures and Human Health: Biomarkers of Exposure and Effect. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8, 629–647.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184–191.

Speit, G., Hartmann, A., 1999. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test): A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair, in: *DNA Repair Protocols*. Humana Press, New Jersey, pp. 203–212.

Sram, R.J., Podrazilova, K., Dejmek, J., Mrackova, G., Pilcik, T., 1998. Single cell gel electrophoresis assay: sensitivity of peripheral white blood cells in human population studies. *Mutagenesis* 13, 99–103.

- Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., Fenech, M., 2009. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 4, 825–837.
- Tolbert, P.E., Shy, C.M., Allen, J.W., 1992. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research* 271, 69–77.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1995. SW-846 EPA. Method 3051, Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils. In: Test methods for evaluating solid wastes: Physical chemical methods. 3.ed. Washington.
- Vargas, V.M., De Brito, K.C.T., Coronas, M.V., 2011. Genetic Biomarkers Applied to Environmental Air Quality: Ecological and Human Health Aspects, in: Mazzeo, N. (Ed.), *Air Quality Monitoring, Assessment and Management*. InTech.
- Vargas, V.M.F., Horn, R.C., Guidobono, R.R., Mittelstaedt, A.B., Azevedo, I.G. de, 1998. Mutagenic activity of airborne particulate matter from the urban area of Porto Alegre, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 21, 247–253.
- Watanabe, M., Ishidate Jr., M., Nohmi, T., 1989. A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. *Mutation Research* 216, 211–220.
- Watanabe, M., Ishidate Jr., M., Nohmi, T., 1990. Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels. *Mutation Research* 234, 337–348.

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de Consentimento e Questionário

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

A pesquisa “Áreas contaminadas: avaliação da genotoxicidade ambiental e populacional” tem como objetivo avaliar sinais iniciais para detectar efeitos da poluição ambiental na saúde humana. Estes sinais podem ser observados através de testes (que avaliam danos nas células) e entrevista individual (informações sobre alimentação, medicamentos, saúde, moradia).

As análises serão realizadas no Laboratório de Biologia da Fundação Estadual de Proteção Ambiental, FEPAM, em trabalho conjunto com o Curso de Pós-graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. Todos os resultados ficarão sob a total responsabilidade dos pesquisadores deste laboratório. A identidade de cada voluntário será mantida em sigilo e você poderá a qualquer momento desistir da participação da criança sob sua responsabilidade, sem que isto leve a qualquer prejuízo.

O desconforto que a criança sob sua responsabilidade passará será mínimo, estando basicamente relacionados à coleta de sangue (4 mL), que implica em uma sensação dolorosa temporária na região da coleta, havendo possibilidade de formação de um pequeno hematoma na região. A coleta de sangue é feita com material limpo, esterilizado e descartável (usado para cada pessoa), sem risco de transmitir AIDS ou outra doença qualquer. Será realizada, também, coleta de células bucais de forma suave, sem dor. Não há risco na coleta destes exames.

O resultado destes exames não apresenta finalidade individual, mas servirá para avaliar a sensibilidade da população de sua região para os poluentes ambientais. O sangue coletado será utilizado para avaliar se há danos no material genético (DNA) e para extração do DNA, a fim de verificar a sensibilidade à exposição a alguns agentes tóxicos e para estudos que esclareçam o papel genético no aumento de risco a danos no DNA.

Os pesquisadores envolvidos no Projeto garantem a você o direito a qualquer pergunta e/ou esclarecimentos mais específicos dos procedimentos realizados.

Esta pesquisa, na qual a criança sob sua responsabilidade será voluntária, poderá trazer grande benefício para a população humana, possibilitando selecionar testes que identifiquem os efeitos iniciais de substâncias perigosas aos organismos antes que ocorram problemas graves de saúde.

Eu, _____ portador da CI _____, residente em _____ - RS, fui informado dos objetivos específicos e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre cada procedimento no qual a criança sob minha responsabilidade estará envolvida e do desconforto, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que as informações obtidas durante o estudo serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa. Os pesquisadores garantiram que as informações geradas terão caráter confidencial.

Caso tiver perguntas novas sobre este estudo, posso chamar os pesquisadores integrantes da equipe de pesquisa do Laboratório de Biologia da FEPAM pelo telefone (51) 3334-6765.

Declaro ainda que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Data ____/____/____

Assinatura do voluntário

Vera Maria Ferrão Vargas

Pesquisadora Responsável

QUESTIONÁRIO

Data ___/___/_____

I – Identificação

Identificação do informante responsável

Nº de registro: _____

Nome: _____

Identidade: _____ Profissão: _____

Data de nascimento: ___ / ___ / _____

Idade: _____

Endereço: _____

CEP: _____ - _____ Telefone para contato: _____

Grau de parentesco com a criança: _____

Identificação da criança

Nº de registro: _____

Nome: _____

Data de nascimento: ___ / ___ / _____

Idade: _____

Sexo: M• F•

Cor (observar): [B] Branco [N] Negro [M] Mulato [A] Amarelo [O] Outros

Endereço: _____

CEP: _____ - _____ Telefone: _____

Nº de registro do voluntário no estudo: _____

II – Criança, mãe e pai biológicos.

1. A <CRIANÇA> vive com:
(1) mãe biológica (2) mãe adotiva (3) outro: _____
2. A <CRIANÇA> nasceu no Brasil:
(1) sim (2) não (8) não sabe (9) não respondeu
SE NÃO Em qual país? _____
3. Qual a idade da mãe biológica? _____
4. Cor da mãe biológica (1) Branca (2) Negra (3) Mulata (4) Amarela (5) Outros
5. A mãe biológica nasceu no Brasil:
(1) sim (2) não (8) não sabe (9) não respondeu
SE NÃO Em qual país? _____
6. Cor do pai biológico (1) Branco (2) Negro (3) Mulato (4) Amarelo (5) Outros
7. O pai biológico nasceu no Brasil:
(1) sim (2) não (8) não sabe (9) não respondeu
SE NÃO Em qual país? _____
8. <CRIANÇA> tem irmão/irmã gêmeo?
(1) sim (2) não (8) não sabe (9) não respondeu
9. Quantos filhos a mãe biológica tem?
_____ filhos (8) não sabe (9) não respondeu
10. A mãe biológica tem algum filho que já tenha falecido?
(1) sim (2) não (8) não sabe (9) não respondeu
SE SIM: Foi no parto? (1) sim (2) não (8) não sabe (9) não respondeu
Outra causa? (1) sim (2) não (8) não sabe (9) não respondeu
Qual? _____ (8) ns (9) nr
11. Você: (0) vive com companheiro (a) / casada (o) (1) solteira (o) (2) viúva (o) (3) desquitada (o) / divorciada(o) (9) não respondeu

12. A <CRIANÇA> vai à escola?

(1) sim (2) não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: Em que escola? _____ Local: _____

13. Onde <CRIANÇA> fica quando não está na escola?

(1) em casa (2) na casa de parentes (3) na casa de amigos (4) outros

(8) não sabe (9) não respondeu

III – Gestação e primeiros meses

14. Durante a gravidez a mãe biológica fumou?

(1) sim (2) não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: Quantos cigarros por dia? _____ cigarros (1) fumava às vezes (8) não sabe (9) não respondeu

15. Durante a gravidez alguém da casa ou do convívio da mãe biológica fumou?

(1) sim (2) não (8) não sabe (9) não respondeu

16. A mãe biológica trabalhou fora (ou para fora) durante a gestação?

(1) sim (2) não (3) não sabe (4) não respondeu

SE SIM: Local? _____ (8) ns (9) nr

Qual a sua ocupação? _____ (8) ns (9) nr

17. **SE SIM:** Nesse seu trabalho as pessoas costumavam fumar na mesma sala/ local em que a mãe biológica trabalhava?

(1) Sim, a maior parte do tempo (2) nunca (3) as vezes (8) não sabe (9) não respondeu

18. O pai da <CRIANÇA> estava trabalhando quando a mãe ficou grávida? (1) sim (2) não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: Local? _____ (8) ns (9) nr

Qual a sua ocupação? _____ (8) ns (9) nr

19. Durante a gravidez a mãe biológica foi exposta à radiação (fez algum raio-x para diagnóstico médico ou dentário)?

(1) sim (2) não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: Quantos? _____ raios-x (8) ns (9) nr

Em que período da gestação? _____ (8) ns (9) nr

20. Durante a gravidez <CRIANÇA> a mãe biológica fez alguma consulta de pré-natal?

(1) sim (2) não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: Em que mês de gestação começou? _____ mês (8) ns (9) nr

Quantas consultas ela fez durante a gravidez? _____ consultas. (8) ns (9) nr

21. Onde nasceu <CRIANÇA>?

(1) Hospital: _____ Cidade: _____

(2) Em casa: _____ Cidade: _____

(3) Outro: _____

(8) não sabe (9) não respondeu

22. O parto <CRIANÇA> foi:

(1) normal (2) normal com fórceps (3) cesárea (8) não sabe (9) não respondeu

23. Qual a idade gestacional quando <CRIANÇA> nasceu?

_____ semanas (8) não sabe (9) não respondeu

24. Quanto <CRIANÇA> pesou ao nascer?

_____ g (8) não sabe (9) não respondeu

25. Quanto <CRIANÇA> mediu ao nascer?

_____ cm (8) não sabe (9) não respondeu

26. <CRIANÇA> foi à creche ou maternal alguma vez?

(1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: Com que idade começou? _____ meses _____ anos (8) ns (9) nr

Com que idade deixou a creche? _____ meses _____ anos (8) ns (9) nr

27. <CRIANÇA> mamou no peito?

(1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: Até que idade mamou? _____ meses _____ dias (8) ns (9) nr

IV – Fumo e outras exposições atuais

28. A mãe está trabalhando no momento?

(1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: Que função desenvolve? _____ (8) ns (9) nr

Local de trabalho: _____ (8) ns (9) nr

Há quanto tempo: _____ (8) ns (9) nr

29. O pai da <CRIANÇA> ou companheiro está trabalhando no momento?

(1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: Que função desenvolve? _____ (8) ns (9) nr

Local de trabalho? _____ (8) ns (9) nr

Há quanto tempo: _____ (8) ns (9) nr

30. Você fuma?

(1) Sim (2) Não (3) Fumou, mas não fuma mais (8) não sabe (9) não respondeu.

SE SIM: Quantos cigarros você fumou por dia, nesta última semana? _____ cigarros

31. O marido/companheiro fuma?

(1) Sim (2) Não (3) Fumou, mas não fuma mais (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: Quantos cigarros fumou por dia, nesta última semana? _____ cigarros

32. Das outras pessoas que moram na sua casa ou do seu convívio, alguma outra fuma?

(1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: quantas pessoas da sua casa, ao todo, fumam? _____ pessoas

33. Costuma você ou outro morador de sua casa pescar nos locais próximos a sua residência para consumo próprio?

(1) Sim Com que frequência no mês? _____ (8) ns (9) nr

Em quais locais? _____ (8) ns (9) nr

(2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

34. Comem peixe pescado na região?

(1) Sim Com que frequência no mês? _____ (8) ns (9) nr

(2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

35. <CRIANÇA> come peixe pescado na região?

(1) Sim Com que frequência no mês? _____ (8) ns (9) nr

(2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

V – Casa

36. Quantas pessoas moram na sua casa? _____ pessoas

37. Quantos entre cinco e onze anos moram na sua casa? _____ Crianças

38. Tem algum animal de estimação na sua casa? Se SIM que tipo de animal tem?

(1) Gato (2) Cachorro (3) Gato e cachorro (4) Passarinho (5) Outros

(6) não tem (8) não sabe (9) não respondeu

39. Tem criação de algum animal? Se SIM de qual(s) animal(s) tem?

(1) Gado (2) Galinha (3) Porco (4) Cabra/Ovelha (5) Outros

(6) não tem (8) não sabe (9) não respondeu

SE TEM: Consome carne ou derivados desses animais?

(1) Leite (2) Carne (3) Ovos (4) Outros (5) não consome (8) não sabe (9) não respondeu

40. Consome carne ou produtos derivados de animais criados nessa área (vizinhos)?

(1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: O que consome? (1) Leite (2) Carne (3) Ovos (4) Outros

Com que frequência por semana? ____ dias na semana (8) ns (9) nr

41. Tipo de casa em que <CRIANÇA> mora:

(1) tijolos com reboco (2) tijolos sem reboco (3) madeira (4) mista (tijolo e madeira) (5) outro: _____ (8) não sabe (9) não respondeu

42. Como é o chão da peça onde <CRIANÇA> dorme?

(1) madeira (tábua ou parque) (2) lajota/ladrilho/tijoleta (3) cimento (4) carpete (5) chão batido (6) outro: _____ (8) não sabe (9) não respondeu

43. Onde a <CRIANÇA> passa mais tempo brincando ?

(1) no quarto em que dorme (2) na sala (3) no quintal/pátio (4) na rua

(5) na casa de amigos (6) outro: _____ (8) não sabe (9) não respondeu

44. Tem água encanada em casa?

(1) Sim, dentro de casa (2) Sim, no Quintal (3) Não (8) não sabe (9) não respondeu.

45. De onde vem a água da casa usada para beber?

(1) CORSAN (2) poço artesiano (3) mineral (4) outro: _____

(8) não sabe (9) não respondeu

46. De onde vem a água da casa usada para banho?

(1) CORSAN (2) poço artesiano (3) outro: _____

(8) não sabe (9) não respondeu

47. Cultiva alguma planta para consumo/alimentação (verduras, frutas, legumes, raízes)?

(1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: De onde vem a água da casa usada para irrigar?

(1) CORSAN (2) poço artesiano (3) Outro: _____

(8) não sabe (9) não respondeu

48. Consome plantas cultivadas nessa área (vizinhos)?

(1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: O que consome? (1) Hortaliças (2) Frutas (3) Raízes (4) Legumes (5) grãos (6) outros (8) não sabe (9) não respondeu

Com que frequência por semana? ____ dias na semana (8) ns (9) nr

49. <CRIANÇA> consome essas plantas cultivadas pela família ou na área (vizinhos)?

(1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: O que consome? (1) Hortaliças (2) Frutas (3) Raízes (4) Legumes (5) grãos (6) outros (8) não sabe (9) não respondeu

Com que frequência por semana? ____ dias na semana (8) ns (9) nr

50. Qual o destino do esgoto da casa?

(1) esgoto público encanado (cloacal) (2) valo direto e/ou arroio (3) fossa e/ou sumidouro (4) não sabe (5) outros (8) não sabe (9) não respondeu

51. Como é a banheiro/sanitário/patente da casa?

(0) sanitário com descarga (1) sanitário sem descarga (2) casinha/fossa negra (3) não tem banheiro (8) não sabe (9) não respondeu

52. É usada alguma coisa para aquecer a casa?

(1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: O que usa para aquecer a casa? (MARQUE TODOS QUE USAR)

(1) estufa elétrica (2) estufa a gás (3) lareira/salamandra (4) álcool

(5) fogão (6) ar condicionado (8) não sabe (9) não respondeu

() outro: _____

53. Tem fogão em casa?

(1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: Que tipo de fogão? (MARQUE TODOS QUE TIVER)

(1) gás (2) elétrico (3) lenha (4) outro: _____ (8) não sabe

(9) não respondeu

SE TEM FOGÃO A LENHA: O fogão tem chaminé para fora de casa

(1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

54. Há quanto tempo vocês moram nesta casa?

_____ anos _____ meses (1) menos de 1 mês (8) não sabe (9) não respondeu

55. Quais os lugares que vocês moraram nos últimos 15 anos?

Onde? Bairro 1: _____

Bairro 2: _____

Bairro 3: _____

Bairro 4: _____

(8) não sabe (9) não respondeu

VI- Saúde da criança

56. Alguma vez na vida a criança teve sibilos (chiado no peito - tipo miado de gato ou apito)?

(1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

57. Nos últimos 12 (doze) meses a criança teve sibilos (chiado no peito - tipo miado de gato ou apito)?

(1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

58. Nos últimos 12 (doze) meses quantas crises de sibilos (chiado no peito - tipo miado de gato ou apito) a criança teve?

- (1) Nenhuma crise (2) uma a três crises (3) 4 a 12 crises (4) Mais de 12 crises
(8) não sabe (9) não respondeu

59. Nos últimos 12 (doze) meses com que frequência a criança teve seu sono perturbado por chiado no peito (tipo miado de gato ou apito)?

- (1) Nunca acordou com chiado (2) Menos de uma noite por semana (3) Uma ou mais noites por semana (8) não sabe (9) não respondeu

60. Alguma vez na vida a criança já teve asma ou bronquite? (1)
Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

61. Nos últimos 12 (doze) meses a criança teve chiado no peito após exercícios físicos?

- (1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

62. Nos últimos 12 (doze) meses a criança teve tosse seca à noite, sem estar gripada ou com infecção respiratória?

- (1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

63. A criança teve rinite alérgica (nariz entupido, nariz escorrendo, espirro e coceira no nariz)?

- (1) Sim, mas não tem mais (2) Sim, ainda tem (3) Nunca teve (8) não sabe (9) não respondeu

64. A criança baixou hospital alguma vez?

- (1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: Quantas vezes a criança baixou no hospital: _____ vezes

Motivos de internações: _____

65. A criança foi levada ao pronto-atendimento/ pronto-socorro por algum problema de saúde?

- (1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: Quantas vezes a criança foi levada? _____ vezes

Motivos de internações: _____

66. A <criança> tomou alguma vacina nos últimos 12 meses?

Se SIM quais são elas? _____

Quando? _____

67. Alguém na sua casa teve ou tem asma/bronquite asmática?

(1) Ninguém teve

(2) Sim, mas não tem mais; quem? _____ , _____

(3) Sim, ainda tem; quem? _____ , _____

(8) não sabe (9) não respondeu

68. Alguém na sua casa teve ou tem rinite alérgica (nariz entupido, nariz escorrendo, espirro e coceira no nariz)?

(1) Ninguém teve

(2) Sim, mas não tem mais; quem? _____ , _____

(3) Sim, ainda tem; quem ? _____ , _____

(8) não sabe (9) não respondeu

69. A <criança> foi exposta à radiação nos últimos 12 meses (fez algum raio-x para diagnóstico médico ou dentário)?

(1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM: Quantos? _____ Há quanto tempo? _____ (8) ns (9)nr

70. A <criança> está usando alguma medicação?

(1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM Qual?

(1) Antibiótico (2) Antiinflamatório (3) Analgésico (4) Vitamina (5) Xarope (6)

Outros (8) não sabe (9) não respondeu

Nome da medicação: _____

Freqüência: _____

71. A <criança> usou alguma medicação nos últimos 12 meses?

(1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu

SE SIM Qual?

(1) Antibiótico (2) Antiinflamatório (3) Analgésico (4) Vitamina (5) Xarope
(6) Outros (8) não sabe (9) não respondeu

Nome da medicação: _____

Frequência: _____

Há quanto tempo deixou? _____

72. Existe alguma coisa sobre a saúde da criança que lhe preocupe e que eu ainda não tenha lhe perguntado?

(1) Sim (2) Não

SE SIM: O quê? _____

73. A <criança> alimenta-se de:

Alimentos construtores:

() carne () peixe () frango () ovos () leite e derivados
(queijo e iogurte) () feijão ou lentilha () grão-de-bico ou soja.

Alimentos reguladores:

() verduras () frutas () legumes

Carboidratos:

() pão () macarrão () cereais, arroz, milho () doces () batata ()
mandioca

Apêndice B – Parecer do Comitê de Ética



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 07-042

Pesquisador Responsável:
VERA MARIA FERRÃO VARGAS

Título: ESTRATÉGIAS ECOTOXICOLÓGICAS PARA CARACTERIZAR ÁREAS CONTAMINADAS COMO MEDIDA DE RISCO À SAÚDE POPULACIONAL - ECORISCO SAÚDE

TCLE PARA ESTUDO COM POPULAÇÃO DE CRIANÇAS (5 A 12 ANOS)

Data da Versão:

29/01/2009

Este documento referente ao projeto acima foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 29 de janeiro de 2009.


Prof. Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA