

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

Dissertação de Mestrado

Lara Martins Prusch

**POTENCIAL MUTAGÊNICO DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁGUA DO MATERIAL  
PARTICULADO ATMOSFÉRICO EM ÁREAS SOB IMPACTO INDUSTRIAL E  
URBANO-RURAL**

Porto Alegre

2022

Lara Martins Prusch

POTENCIAL MUTAGÊNICO DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁGUA DO MATERIAL  
PARTICULADO ATMOSFÉRICO EM ÁREAS SOB IMPACTO INDUSTRIAL E  
URBANO-RURAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ecologia do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para o título de mestre (a) em ecologia.

Orientação: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vera Maria Ferrão Vargas

Comissão Examinadora

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lucia Ribeiro Rodrigues

Dr<sup>a</sup> Kelly Cristina Tagliari de Brito

Dr<sup>a</sup> Helena Campos Rolla

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Prusch, Lara Martins  
POTENCIAL MUTAGÊNICO DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁGUA DO  
MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO EM ÁREAS SOB IMPACTO  
INDUSTRIAL E URBANO-RURAL / Lara Martins Prusch. --  
2022.  
65 f.  
Orientadora: Vera Maria Ferrão Vargas.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Programa  
de Pós-Graduação em Ecologia, Porto Alegre, BR-RS,  
2022.

1. Poluição atmosférica. 2. Material Particulado.  
3. Diretrizes de qualidade do ar. 4. Ensaio de  
genotoxicidade. 5. Ensaio Salmonella/microsoma. I.  
Ferrão Vargas, Vera Maria, orient. II. Título.

**Dedico este trabalho aos meus pais, Carlos e Vera, que sempre me inspiram a ter confiança, esperança, perseverança e, sobretudo, por terem me apoiaram nessa jornada de estudos. Amo vocês.**

## AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento a todos aqueles que estiveram ao meu lado, dando suporte e coragem durante este período de mestrado.

Em especial, aos meus pais, Vera e Carlos, por estarem sempre ao meu lado e me apoiarem em todas minhas escolhas. A dedicação de vocês para com minha educação foi essencial para que eu chegasse onde cheguei. Devo isso a vocês. Essa conquista é por vocês e para vocês! Agradeço, também, aos meus irmãos, sobretudo, à minha irmã Carla, a qual me ensinou a ler, demonstrando, ainda na infância, seu dom com a docência e seu excesso de zelo e cuidado comigo.

Agradeço ao meu sobrinho Théo, que mesmo tão pequeno, me incentiva desde antes de nascer a ser alguém melhor e querer construir um mundo melhor.

Aos amigos que me apoiam e aguentam minhas respostas sempre tão clichês: “não posso, tenho que estudar”. Obrigada por terem compreendido, por tantas vezes, minha ausência. Em especial aos amigos de longa caminhada, Radharani, Micheli, Janaina, Caroline, Jéssica e Natalie. Às amigas que chegaram depois, porém não menos importante, Joanna e Liziane.

À UFRGS pela oportunidade de me proporcionar o curso de Pós-Graduação em Ecologia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, aos professores, colegas e funcionários.

Aos colegas do Laboratório de Mutagênese Ambiental, que contribuíram de alguma forma para a realização dos meus ensaios. Em especial, à IC Karoline Zenato, que foi essencial durante este período. Obrigada pela parceria para realização dos ensaios.

À minha orientadora Vera Maria Ferrão Vargas, por abrir as portas do laboratório para mim, me proporcionando realizar este trabalho. Obrigada pela incansável dedicação e, sobretudo, paciência.

À Equipe de amostragem da FEPAM, pela realização das coletas das amostras de ar.

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

**“Seja qual for o rumo que tomarmos, nosso destino está indissolúvelmente ligado à ciência”.**

**Carl Sagan**

## RESUMO

A integridade do ar é considerada um dos quesitos primordiais para saúde humana e para o meio ambiente. Uma gama de substâncias químicas emitida na atmosfera por fontes naturais e antrópicas, pode comprometer a qualidade do ar, persistir no ambiente, e interferir no fluxo de energia e nutrientes da cadeia biológica, causando danos à saúde pública e aos ecossistemas. A Organização Mundial da Saúde alertou um crescimento de 8% nos níveis anuais de partículas atmosféricas no planeta em período de cinco anos, estimando que cerca de 3,1 milhões de mortes no mundo sejam causadas pelo material particulado atmosférico. Este é uma mistura heterogênea de substâncias orgânicas e inorgânicas, em estado líquido ou sólido que pode se manter em suspensão na atmosfera e se deslocar por longas distâncias. Essas partículas são reconhecidas como um indicador da poluição ambiental, consideradas pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como agente carcinogênico (grupo 1) para humanos, sem limites de concentração seguros. A maioria das pesquisas que embasam estas recomendações focalizam os efeitos da fração de compostos orgânicos adsorvidos ao material particulado (MP). No entanto, relativamente poucos estudos têm avaliado a genotoxicidade de compostos inorgânicos associada ao MP. Pesquisas avaliando estes efeitos da fração orgânica do MP inalável fino (MP<sub>2,5</sub>;  $\leq 2,5\mu\text{m}$ ), no Rio Grande do Sul, detectaram compostos mutagênicos em amostras consideradas dentro dos parâmetros permitidos pela legislação ambiental brasileira. O presente estudo propôs avaliar, através do ensaio *Salmonella*/microsoma, a citotoxicidade/genotoxicidade da fração solúvel em água (FSA) do MP<sub>2,5</sub> em área sob impacto industrial petroquímico e urbano-rural, já investigada quanto à presença de compostos orgânicos mutagênicos. As concentrações de MP<sub>2,5</sub> amostradas nesse período (2013) estavam dentro dos limites em vigor pela legislação brasileira (10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  e 25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , para período anual e 24h, respectivamente). Os resultados obtidos nos ensaios com a FSA mostraram compostos mutagênicos em todas as amostras analisadas, com variações nesta

resposta nas diferentes estações do ano. Os valores de mutagênese direta foram predominantes, sendo os mais elevados observados frente à linhagem TA97a ( $426,85 \pm 143,221 \text{ rev/m}^3$ ), que mede danos por erro no quadro de leitura do DNA. Esta linhagem *Salmonella* é descrita como mais sensível a compostos metálicos. A indução de mutagênese direta por erro no quadro de leitura (TA98-S9) também foi detectada em menores valores nas estações de outono, inverno e verão. Respostas semelhantes de mutagênese direta por substituição de pares de bases foram detectadas frente à linhagem TA102 nos pools de outono ( $25,04 \pm 9,183 \text{ rev/m}^3$ ) e primavera ( $25,82 \pm 5,651 \text{ rev/m}^3$ ), além de indiretos ( $8,74 \pm 3,278 \text{ rev/m}^3$ ), gerado por metabólitos induzidos pela fração S9 in vitro no verão. Esta linhagem é sensível a estresse oxidativo, o que sugere a presença de compostos metálicos na FSA investigada. A integração destas informações numa mesma área de estudo permite alertar para o somatório de reações, alterações e efeitos, a que os compostos orgânicos e inorgânicos adsorvidos ao MP inalável podem expor diferentes organismos e desencadear danos graves à saúde de humana. Estas informações corroboram com as recomendações da IARC e OMS quanto à inexistência de limites seguros para exposição ao MP. Além disso, alertam para a presença de compostos mutagênicos biodisponíveis na FSA. A integração destas informações poderá auxiliar na escolha de estratégias mais adequadas para controle da poluição.

Palavras-chave: Material Particulado, metais pesados, fração solúvel em água, genotoxicidade, *Salmonella*/microsoma.

## ABSTRACT

Air integrity is considered one of the main requirements for human health and the environment. A range of chemical substances released into the atmosphere from natural and anthropic sources may compromise the quality of air, persist in the environment and interfere in the flow of energy and nutrients in the biological chain, causing damage to public health and ecosystems. The World Health Organization warned of an 8% growth in the annual levels of atmospheric particles on the planet in a five-year period, estimating that about 3.1 million deaths in the world are caused by atmospheric particulate matter. This is a heterogeneous mixture of organic and inorganic substances in liquid or solid state that can remain in suspension in the atmosphere and travel long distances. These particles are recognized as an indicator of environmental pollution, considered by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a carcinogenic agent (group 1) in humans, without safe concentration limits. Most of the research that forms the base of these recommendations focuses on the effects of the fraction of organic compounds adsorbed on the particulate matter (PM). However, relatively few studies have evaluated the genotoxicity of inorganic compounds associated with PM. Research studies evaluating these effects of the organic fraction of fine inhalable PM (PM<sub>2.5</sub>;  $\leq 2.5\mu\text{m}$ ), in Rio Grande do Sul, detected mutagenic compounds in samples considered within the parameters allowed by Brazilian environmental law. The present study proposed using the *Salmonella*/microsome assay to evaluate the cytotoxicity/genotoxicity of the water-soluble fraction (WSF) of PM<sub>2.5</sub> in an area under petrochemical and urban-rural industrial impact, already investigated for the presence of mutagenic organic compounds. The PM<sub>2.5</sub> concentrations sampled during this period (2013) were within the limits in force according to Brazilian law ( $10\ \mu\text{g}/\text{m}^3$  and  $25\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ , for an annual period and 24h, respectively). The results obtained in the assays with WSF showed mutagenic compounds in almost all samples analyzed with variations in this response in the different seasons of the year. The direct mutagenesis

values detected in assays in the absence of hepatic metabolization fraction in rats in vitro (Fraction S9) were predominant, and the highest were observed in autumn against strain TA97a ( $426.85 \pm 143.221 \text{ rev/m}^3$ ), which measures damage per frameshift error of DNA. This *Salmonella* strain is described as more sensitive to metal compounds. The induction of direct mutagenesis by frameshift error (TA98-S9) was also detected in lower values in the autumn, winter and summer seasons. Similar responses of direct mutagenesis by base pair substitution were detected against the TA102 strain in the autumn ( $25.04 \pm 9.183 \text{ rev/m}^3$ ) and spring ( $25.82 \pm 5.651 \text{ rev/m}^3$ ) pools, besides indirect ones ( $8.74 \pm 3.278 \text{ rev/m}^3$ ), generated by metabolites induced by the S9 fraction in vitro in summer. This strain is sensitive to oxidative stress, which suggests the presence of metal compounds in the WSF investigated. The integration of this information in a same area of study allows alerting to the sum total of reactions, changes and effects, to which the organic and inorganic compounds adsorbed on inhalable PM may expose different organisms and trigger severe damage to human health. This information corroborates the recommendations of IARC and WHO regarding the non-existence of safe limits of exposure to PM. This also calls attention to the presence of mutagenic compounds bioavailable in WSF. The integration of this information may help choose more appropriate strategies to control pollution.

Key-words: Particulate Matter, heavy metals, water-soluble fraction, genotoxicity, *Salmonella*/microsome.

## LISTA DE ABREVIACÕES

2AF – aminofluoreno

4NQO – oxidonitroquinolina

ANOVA - Análise de Variância

As – Arsênio

ATP – Adenosina Trifosfato

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Cd – Cádmio

Co – Cobalto

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

Cr – Cromo

Cu – Cobre

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

Fe – Ferro

FEE – Fundação de Economia e Estatística

FEPAM – Fundação Estadual de Proteção Ambiental Luis Henrique Roessler

FSA – Fração Solúvel em Água

HPA/PHA – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

IARC – Agência de Pesquisa sobre o Câncer

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IQAr – Índice de Qualidade do Ar

Mn – Manganês

MN – Micronúcleo

MP – Material Particulado Atmosférico

MP2,5 – Material Particulado Atmosférico com tamanho aerodinâmico <2,5 µm

MP10 – Material Particulado Atmosférico com tamanho aerodinâmico <10 µm

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

Ni – Níquel

NO – Noroeste

OMS – Organização Mundial da Saúde

Pb – Chumbo

PIBIC – Programa Institucional de Bolsas de iniciação científica

PCB – Bifenilas Policloradas

PI – Padrões Intermediários

PI1 – Padrão Intermediário 1

PI2 – Padrão Intermediário 2

PI3 – Padrão Intermediário 3

PF – Padrão Final

PTS – Partículas Totais em Suspensão

RS – Rio Grande do Sul

Sb – Antimônio

Sc – Escândio

Se – Selênio

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

S9 – fração de metabolização

Ti – Titânio

UF – Ultrafinas

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

US EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

V – Vanádio

Zn – Zinco

WHO – World Health Organization

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1.	POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA	16
1.2.	MATERIAL PARTICULADO	17
1.3.	DIRETRIZES DE QUALIDADE DO AR	18
1.4.	ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE	21
1.5.	ENSAIO <i>SALMONELLA</i> /MICROSSOMA	22
1.6.	FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁGUA	24
2.	ÁREA DE ESTUDO	27
3.	OBJETIVOS	29
3.1.	OBJETIVO GERAL	29
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4.	ARTIGO CIENTÍFICO	30
1.	INTRODUÇÃO	32
2.	METODOLOGIA	34
2.1.	ÁREA DE ESTUDO	34
2.2.	AMOSTRAGEM DE MATERIAL PARTICULADO	35
2.3.	EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁGUA	36

2.4.	RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO INORGÂNICA	36
2.5.	AVALIAÇÃO MUTAGÊNICA <i>IN VITRO</i>	37
2.6.	ANÁLISE DE DADOS	38
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.	CONCLUSÃO	44
5.	REFERÊNCIAS	45
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
6.	REFERÊNCIAS	52
7.	ANEXO A – MODELO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA (SALANAL)	62
8.	ANEXO B – MODELO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA (SALANAL)	64

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Poluição Atmosférica**

A integridade do ar é considerada um dos quesitos primordiais para saúde humana e para o meio ambiente (WHO, 2021; Chen; Kan, 2008). O ar sofre influência de fatores naturais e antrópicos, condições atmosféricas, geográficas e emissões de diversas fontes, que podem persistir no ambiente, interferindo no fluxo de energia e nutrientes da cadeia biológica. Substâncias químicas emitidas por fontes naturais, como os processos de decomposição de plantas, incêndios florestais e erupções vulcânicas, podem comprometer a qualidade do ar.

Embora datada desde o início da utilização do fogo pelo ser humano, a poluição gerada por fontes antropogênicas vem aumentando desde o início da industrialização (WHO, 2021). Devido aos processos de desenvolvimento econômico e às atividades humanas atreladas a este, uma gama de substâncias químicas é emitida na atmosfera, em quantidades que podem variar de centenas a milhares de toneladas por ano (WHO, 2021). A Organização Mundial da Saúde (OMS) observou crescimento de 8% nos níveis anuais de partículas atmosféricas no planeta em período de cinco anos (WHO, 2016).

A exposição a poluentes vem despertando crescente interesse, pois diversos estudos reportam sua associação com efeitos adversos ao ambiente, afetando a estabilidade dos ecossistemas, refletindo nas populações naturais e na saúde pública global, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (Grantz et al., 2003; Vargas, 2003; Kaffer et al., 2012). Dentre os efeitos adversos relacionados à saúde humana, há maior predominância de problemas respiratórios e cardiovasculares acarretados pela exposição a curto e longo prazo (Chen; Kan, 2008). Além disso, a poluição do ar deve ser considerada como uma das causas que contribui para o aumento da incidência de câncer (Vargas, 2003). Pope, 2002 estimou que para cada 10 mg de partículas finas por metro cúbico inaladas, a mortalidade por câncer de pulmão aumenta 8%.

## 1.2. Material Particulado

O Material Particulado (MP) representa maior perigo para a saúde humana do que o ozônio troposférico e/ou outros poluentes atmosféricos comuns como o monóxido de carbono, por exemplo (Kim et al., 2015). Estima-se que milhões de mortes ao ano estão associadas à poluição ambiental no mundo (Shah et al., 2013). Segundo a OMS (WHO, 2013), o MP é responsável pela morte prematura de 3,1 milhões de pessoas no mundo, sobretudo nos países em desenvolvimento, onde os níveis de particulados no ar são mais elevados.

Dada a complexidade de composição química e interações com os sistemas biológicos, o MP é reconhecido como um indicador da poluição ambiental (Lemos et al., 2020), considerado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como agente carcinogênico (grupo 1) para humanos, sem limites de concentração seguros (IARC, 2016).

O material particulado não é um poluente único, mas sim uma mistura heterogênea complexa de partículas em estado líquido ou sólido com composição variada que pode se manter em suspensão na atmosfera por muito tempo e ser transportado por longas distâncias (Grantz et al., 2003; Kim; Kabir; Kabir, 2015; Ramírez et al., 2020). Dentre os constituintes químicos do MP, pode-se incluir compostos orgânicos (como, por exemplo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPA's), compostos biológicos (endotoxinas, bactérias e vírus, por exemplo) e metais (como ferro, cobre e níquel) (WHO, 2013). Essas partículas podem ser provenientes de fontes naturais (atividade vulcânica, decomposição de matéria orgânica ou incêndios florestais naturais) (Kannan et al., 2006) ou de atividades antrópicas (veículos, usinas termelétricas, siderúrgicas, fábricas de cimento e papel, refinarias de petróleo (Artaxo et al., 1988; Srimuruganandam; Shiva Nagendra, 2012).

Contudo, embora possua natureza química, estrutura e fontes diversas, é o tamanho aerodinâmico o principal critério para classificá-lo e descrever sua capacidade de ser transportado na atmosfera e de ser inalado através da respiração (Grantz et al., 2003; Esworthy,

2013). Entre as partículas totais em suspensão (PTS), o MP com diâmetro  $\leq 10\mu\text{m}$  (MP10) compreende a fração inalável, sendo as partículas inaláveis finas (MP2,5)  $\leq 2,5\mu\text{m}$  e ultrafinas (UF) as  $\leq 0,1\mu\text{m}$ . O MP2,5 pode permanecer em suspensão por semanas ou meses, podendo ser transportado por centenas ou milhares de quilômetros (WHO, 2006).

Estudos epidemiológicos mostraram a associação entre a exposição a altos níveis de MP e a incidência de mortalidade causada por doenças respiratórias, cardiovasculares e câncer de pulmão (Anderson et al., 2012; Demetriou; Vineis, 2015). Os efeitos biológicos adversos associados ao material particulado são inversamente proporcionais ao seu tamanho aerodinâmico (Brook et al., 2010; Kim, Kabir, Kabir, 2015). O MP10 é capaz de penetrar na região extratorácica do trato respiratório (Kim; Kabir; Kabir, 2015). Já o MP2,5 se deposita nos bronquíolos e nos alvéolos, onde ocorrerem as trocas gasosas, podendo atingir os tecidos pulmonares e entrar na corrente sanguínea, ocasionando agravos de saúde significativos (Fu et al., 2011; Kim; Kabir; Kabir, 2015). Contudo, embora os efeitos gerados pelo MP estejam mais relacionados com o tamanho da fração da partícula e com sua composição química, as diretrizes de qualidade do ar baseiam-se na concentração de MP de acordo com seu tamanho aerodinâmico (Coronas et al., 2009; Alves et al., 2011; Jin et al., 2019).

### **1.3. Diretrizes de qualidade do ar**

A preocupação com a poluição atmosférica, seus impactos na saúde humana e no ambiente embasou a edição de diretrizes de qualidade do ar por agências reguladoras, a fim de estabelecer limites ou recomendações com base na concentração de partículas transportadas pelo ar com diferentes diâmetros aerodinâmicos (WHO, 2021). No Brasil, a concentração do MP atmosférico é regulada pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) por meio da Resolução nº491/2018 (BRASIL, 2018), válida a partir de 19/11/2018. Os padrões atuais estabelecidos para MP2,5 correspondem aos Padrões Intermediários (PI1, PI2 e PI3), alcançados de forma escalonada até atingir aos Padrões Finais (PF). Esses padrões variam de

60  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  a 25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  para período de 24h; e de 20  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  a 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , para a média anual) (BRASIL, 2018) (Tabela 1). Os valores de PF estabelecidos pela legislação brasileira e recomendados pela OMS estão apresentados na Tabela 1.

No Rio Grande do Sul (RS), a Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM) ([Fepam.rs.gov.br/qualidade/iqar.asp](http://Fepam.rs.gov.br/qualidade/iqar.asp)) propõe o Índice de Qualidade do Ar (IQAr) baseado nos Padrões Nacionais de Qualidade do Ar e nos critérios para episódios agudos da poluição do ar (BRASIL, 2018). Estes são estabelecidos para cinco poluentes, a saber, partículas inaláveis, dióxido de enxofre, dióxido de nitrogênio, ozônio e monóxido de carbono. Os critérios de qualidade do ar em relação ao MP2,5 considerados dentro da qualidade BOA atendem até o padrão PF (0 a 25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) e a qualidade REGULAR até o padrão da etapa P11 (26 a 60  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) para médias diárias. Os valores correspondentes aos PF adotados pela legislação brasileira (Brasil, 2018) atendem aos valores-guias estabelecidos pela OMS em 2005 (WHO, 2005).

Contudo, desde a última atualização global da OMS em 2021, houve um aumento de evidências de que a poluição do ar acarreta danos à saúde humana e contribui para mudanças no clima em concentrações ainda mais baixas do que se esperava (WHO, 2021). Por esse motivo, em 2021, a OMS revisou suas Diretrizes de Qualidade do Ar, tornando-as mais rigorosas, estabelecendo limites para MP2,5 em 5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (média diária) e 15  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (média anual), alertando que exceder os novos níveis das diretrizes de qualidade do ar traz riscos significativos para a saúde e que a adoção dos valores propostos pelas diretrizes atuais pode evitar 80% das mortes relacionadas ao MP2,5 em nível global (WHO, 2021).

A OMS informou, nessas novas diretrizes, que grupos de pessoas sensíveis como recém-nascidos, crianças com menos de 15 anos, idosos, pessoas com predisposição a doenças cardiovasculares e pulmonares, podem ser afetados mesmo em concentrações baixas de poluentes. Alerta, ainda, que a ocorrência desses agravos na saúde pode ser resultado da

exposição combinada a vários produtos químicos (WHO, 2021). Além da saúde pública, ecossistemas podem ser indiretamente afetados através do efeito do MP. Ao ser lançado na atmosfera, esse poluente pode ser levado por longas distâncias por meio da ação do vento e vir a se depositar no solo ou na água, gerando uma série de modificações, como a acidificação de lagos e rios, alteração do balanço de nutrientes nas águas costeiras e nas bacias hidrográficas (USEPA, 2021). Além disso, o MP exerce influência no clima, devido à sua capacidade de refletir a radiação solar de volta para o espaço e de formar núcleos de condensação de nuvens (Seinfeld; Pandis, 2006).

A tentativa de reduzir os níveis de poluição é uma tarefa bastante complexa. Analisar quais produtos químicos estão presentes no ar, em que quantidade e se os níveis prováveis de exposição são perigosos para a saúde humana e para o ambiente é insuficiente. As diretrizes tratam de poluentes únicos, como o MP, não levando em consideração a composição química que neles pode ocorrer, bem como os efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos entre os constituintes dessa mistura.

**Tabela 1:** Valores de concentrações para MP2,5 e MP10 em períodos diários e anuais.

		BRASIL/2018	WHO/2021
		( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) <sup>a</sup>	( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) <sup>a</sup>
MP2,5	Diário	25	15
	Anual	10	5
MP10	Diário	50	45
	Anual	20	15

<sup>a</sup>Padrões finais (PF) estabelecidos pela legislação brasileira e recomendados pela OMS (BRASIL, 2018; WHO, 2021).

#### **1.4. Ensaios de genotoxicidade**

Alguns contaminantes atmosféricos são genotóxicos, ou seja, podem lesar a estrutura ou função da molécula de DNA, acarretando alterações subseqüentes em nível molecular, celular e tecidual nos organismos (Ohe; Watanabe; Wakabayashic, 2004). Esses agentes genotóxicos são capazes de induzir mutações e danificar a linhagem germinativa, levando a problemas de fertilidade e a mutações nas gerações futuras (Mortelmans; Zeiger, 2000). Embora sejam normalmente corrigidas pelo próprio mecanismo de reparo das células, alterações no material genético não reparadas ou erroneamente reparadas originam mutações pontuais e/ou cromossômicas (Pfeiffer et al., 1996). Mutações não-específicas podem acumular-se no genoma e persistir na população, resultando, eventualmente, em perda de diversidade genética e, conseqüentemente, em redução da adaptabilidade e do tamanho populacional (Belfiore; Anderson, 2001).

Estudos evidenciando que os resíduos industriais podem induzir efeitos genotóxicos em espécies aquáticas e terrestres, incluindo o ser humano, têm estimulado o desenvolvimento e uso de ensaios genéticos de curta duração. Estes são ferramentas que permitem a detecção do efeito de uma ampla variedade de substâncias químicas e de suas interações, mesmo quando ocorrem em baixas concentrações (Kessler et al., 2012). Biomarcadores são respostas biológicas correspondentes à exposição, efeito ou susceptibilidade dos indivíduos aos agentes químicos e/ou estressores ambientais (Van der Oost; Beyer; Vermeulen, 2003), evidenciadas por alterações celulares, bioquímicas ou moleculares medidas em meio biológico como tecidos, células ou fluídos (Hulka, 1990; Souza, 2006). Ainda, compreendem a determinação de substâncias, seus produtos de biotransformação e interação com biomoléculas nos organismos (Yusa et al., 2012). Os biomarcadores são considerados indicadores precoces de contaminação, sendo ferramentas adequadas na adoção de medidas preventivas aos danos causados pela

poluição (Van der Oost; Beyer; Vermeulen, 2003; Silva et al., 2015; Lemos et al., 2016; Lemos et al., 2020).

Os biomarcadores de genotoxicidade são considerados indicadores precoces de contaminação e vêm sendo amplamente utilizados para análises de risco relativo ambiental. A realização de avaliações de genotoxicidade em diferentes níveis celulares se constitui uma importante ferramenta na avaliação e prevenção da poluição, conservação e uso sustentável do ambiente. Existem diversos ensaios para detectar a mutagenicidade/genotoxicidade de amostras ambientais, mas a utilização de ensaios com bactérias provou ser mais eficaz para monitoramento por serem sensíveis, confiáveis e com custo relativamente baixo. Entre estes, o ensaio *Salmonella*/microsoma é o método mais amplamente utilizado para identificar atividade mutagênica em amostras ambientais (Claxton; Woodall, 2007; Claxton, 2010).

### **1.5. Ensaio *Salmonella*/microsoma**

O ensaio *Salmonella*/microsoma, também conhecido como Teste de Ames, foi desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames (1971), revisado por Maron, Ames (1983) e modificado por Kado, Langley e Eisenstatd (1983). Este ensaio, um dos testes *in vitro* mais amplamente empregados, é uma metodologia de triagem segura e constantemente atualizada para detectar substâncias genotóxicas (Ames; Lee; Durston, 1973; Ames; McCann; Yamasaki, 1975; Maron; Ames, 1983; Mortelmans; Zeiger, 2000; Umbuzeiro; Vargas, 2003; Umbuzeiro et al., 2009).

O ensaio *Salmonella*/microsoma é um teste de curta duração e atua em nível molecular, empregando linhagens da bactéria *Salmonella typhimurium* derivadas da parental LT2, apresentando diferentes mutações no *operon* da histidina, geradas por engenharia genética. Tais linhagens foram construídas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura (TA97a e TA98) e substituição de pares de bases no DNA (TA102). Estas mutações tornam as cepas da bactéria auxotróficas para o aminoácido histidina, transformando-as em linhagens histidina dependentes (His-) (Ames; Lee; Durston, 1973). Esta alteração genética faz com que

as bactérias sejam incapazes de crescer e formar colônias em meio de cultura sem este aminoácido (Maron; Ames, 1983; Mortelmans; Zeiger, 2000). No entanto, compostos mutagênicos podem reverter a mutação original e restaurar a função do gene e a capacidade de síntese do aminoácido, permitindo que as bactérias possam crescer em meio restritivo para histidina e formar colônias. A frequência de mutação reversa das linhagens é medida pela contagem de colônias macroscópicas que crescem no meio mínimo após a exposição das células ao agente mutagênico.

Além desta característica genética, as linhagens *Salmonella* apresentam outras mutações que aumentam a capacidade/sensibilidade para detectar mutágenos. A mutação *rfa*, por exemplo, gera uma perda parcial da barreira de lipopolissacarídeos aumentando a permeabilidade da parede celular, permitindo que moléculas de até 30 nm possam penetrar na célula. Há também a mutação *uvrB* (exceto a linhagem TA102, que possui reparo), uma deleção do gene que codifica o sistema de reparo por excisão do DNA tornando-as mais sensíveis para detectar mutágenos (Ames; McCann; Yamasaki, 1975; Maron; Ames, 1983).

Algumas substâncias, conhecidas como pró-mutágenos ou mutágenos indiretos (pois *per se* não alteram o DNA), necessitam ser ativadas ou não por um sistema de metabolização para serem detectadas. Por esse motivo, os ensaios *in vitro* são associados a um sistema de ativação metabólica contendo fração microsomal S9, composta por um homogenato de células de fígado de rato (*Sprague-Dawley*) centrifugado a 30,000 x g (microsomas). A mais empregada internacionalmente é induzida por bifenilas policloradas (PCB) – Aroclor 1254. Além da fração S9, o sistema de ativação metabólica é composto por cofatores, como glicose-6-fosfato e NADPH e necessita de condições de pH específicas para que as reações de metabolização possam ocorrer (Maron; Ames, 1983; Umbuzeiro; Vargas, 2003; Claxton; Umbuzeiro; De Marini, 2010).

### 1.6. Fração solúvel em água

O teste *Salmonella*/microsoma vem sendo empregado em estudos da qualidade do ar no Estado do Rio Grande do Sul desde 1995, permitindo identificar o potencial mutagênico de PTS e MP10 em áreas urbanas e industriais com influência petroquímica (Coronas et al., 2008; 2009; Ducatti & Vargas, 2003; Kaffer et al., 2012; Pereira et al., 2010; Vargas et al., 1998; Vargas, 2003). Recentemente, estudos desenvolvidos avaliando MP2,5 de áreas urbanas, industriais e mistas mostraram a presença de compostos mutagênicos em amostras consideradas dentro dos parâmetros permitidos pela legislação ambiental brasileira ou recomendados pela OMS (Brito et al., 2013; Coronas et al., 2016; Lemos et al., 2012, Lemos et al., 2016; Silva et al., 2015).

As revisões internacionais apontam que a detecção, caracterização e a presença de compostos genotóxicos no ar ambiente têm sido investigadas, principalmente, por meio do teste *Salmonella*/microsoma, compreendendo cerca de 50% dos estudos (Claxton; Matthews; Warren, 2004; Claxton; Woodall, 2007; Claxton; Umbuzeiro; De Marini, 2010). Claxton, Matthews e Warren (2004) mostrou que centenas de compostos de diferentes classes químicas presentes na atmosfera são mutagênicos e que a atividade carcinogênica é atribuída, principalmente, aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's), nitroarenos e outros compostos aromáticos. No entanto, os autores ressaltam que os HPA's comumente monitorados não poderiam explicar a mutagenicidade associada à maioria das partículas e que, portanto, a medição dos HPA's, por si só, é insuficiente para prever o nível de substâncias cancerígenas na atmosfera. Os tipos de interações (aditivas, sinérgicas, de interferência) entre os componentes de uma mistura complexa têm sido objeto de muita discussão e pesquisa, uma vez que a atmosfera não é um ambiente estático e que os produtos químicos emitidos por qualquer fonte estão sujeitos a reações químicas com os componentes naturais da atmosfera, bem como com outros produtos químicos emitidos, e que essas interações podem levar à produção adicional de

compostos genotóxicos. Apesar de centenas de compostos genotóxicos já terem sido identificados no ar, não é possível fazer uma estimativa precisa de como as misturas podem interagir com base apenas no que é conhecido dos constituintes individuais, sobretudo porque apenas alguns são rotineiramente monitorados.

Mundialmente, a maioria dos estudos sobre o potencial genotóxico do MP tem avaliado a fração de compostos orgânicos extraíveis. No entanto, poucos estudos têm avaliado a genotoxicidade da fração solúvel em água (FSA) associada ao MP (Claxton; Woodall, 2007; Lemos et al., 2012; Claxton, 2015; Palacio; Roubicek, 2016; Palacio et al., 2016). No Brasil, apenas três estudos analisaram este tema: Lemos et al. (2012) mostraram a presença de metais tóxicos em MP<sub>2,5</sub> no sul do Brasil, enquanto Palacio et al. (2016) observaram correlação positiva entre a concentração de metais hidrossolúveis e a resposta genotóxica em MP<sub>10</sub> no estado de São Paulo.

A OMS alerta que os níveis de poluentes atmosféricos podem ser mais elevados em locais próximos de fontes específicas de emissão, como grandes complexos industriais, sendo necessárias medidas especiais de proteção do ecossistema no entorno dessas emissões (WHO, 2021). As principais fontes antropogênicas de metais e metaloides estão associadas à combustão de carvão e petróleo, às indústrias metalúrgicas/cerâmicas/cimento, incineração de resíduos e emissões relacionadas ao tráfego (Khillare; Sarkar, 2012; Duan; Tan, 2013; Cheng et al., 2018), atividades concentradas principalmente em cidades populosas, onde a população está constantemente exposta a partículas metálicas.

Essas atividades industriais e a urbanização têm aumentado a concentração de metais pesados na atmosfera por uma variedade de processos e rotas, que incluem sua liberação diretamente no ar, nas águas e solos, bem como via escoamento superficial e lixiviação para as águas superficiais e subterrâneas (Bradl, 2005; Jarup, 2003). Os metais ou compostos organometálicos no MP oriundos de fontes antropogênicas podem estar presentes na FSA em

formas altamente móveis e, portanto, potencialmente biodisponíveis (Vargas, 2003; Quitério et al., 2004; Palacio et al., 2016b), podendo influenciar nas funções biológicas.

Devido a sua capacidade tóxica e de bioacumulação, os metais pesados são de grande significado ecológico. Suas características tóxicas dependem das concentrações e espécies químicas que estão presentes no ambiente (Schnoor, 1996). O Antimônio (Sb), por exemplo, um representante metaloide pertencente aos oligoelementos, tem sua toxicidade relacionada com o estado de oxidação, sendo o Sb (III) mais tóxico do que Sb (V) (Wu; Sun, 2016). No entanto, estudos avaliando a especiação desses poluentes na atmosfera são ainda escassos (He et al., 2019).

A literatura relata que os metais como As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sb, Sc, Se, Ti, V e Zn associados ao MP podem causar variados efeitos adversos. Dentre esses, arsênio, cádmio, chumbo, cromo e níquel possuem efeito mutagênico e/ou clastogênico (Tsalev; Zaprianov, 1983; White; Claxton, 2004). Estudos toxicológicos sugerem que os efeitos genotóxicos do MP são induzidos principalmente por meio de processos inflamatórios e relacionados ao estresse oxidativo. Metais presentes no MP, especialmente o ferro, podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) (Kadiiska et al., 1997). As ERO's resultam em danos celulares e teciduais, gerando processos inflamatórios. Estes acentuam doenças pré-existentes das vias aéreas ou comprometendo a função dos mecanismos de defesa pulmonar, aumentando a produção de antígenos ou elevando a suscetibilidade dos pulmões a infecção por microrganismos. Os metais podem ainda causar danos ao DNA, inibindo os sistemas de reparo, causando instabilidade genômica, acúmulo de mutações ou levando ao desenvolvimento de doenças neurológicas e câncer (Roubicek et al., 2007; Velali et al., 2016, Heal et al., 2005, Beyersmann; Hartwig, 2008; Lemos et al., 2012; Palacio et al., 2016).

Considerando que os padrões de qualidade do ar não garantem a saúde das populações expostas (WHO, 2021), faz-se necessário a adoção de novas estratégias de controle da poluição do ar. Assim, a determinação na FSA de elementos mutagênicos contribui com informações sobre a sua origem e biodisponibilidade em causar efeitos deletérios na biota, nos ecossistemas e na saúde humana. O efeito de bioacumulação apresentado por alguns metais reforça a necessidade de monitorar sua presença no ambiente, bem como sua possível biodisponibilidade (Fernández Espinosa, 2002; Kouba; Buric; Kozák, 2010; Nagajyoti; Lee; Sreekanth, 2010; Lemos et al., 2012; Palacio et al., 2016).

A análise conjunta dos efeitos de diferentes frações (orgânicas e inorgânicas) permite uma avaliação integradora da qualidade das matrizes ambientais complexas (Lemos et al., 2012). A associação destas informações permite a escolha de estratégias mais adequadas de controle da poluição. Neste contexto, o presente estudo propõe agregar informações sobre a composição e os efeitos genotóxicos da fração solúvel em água do MP2,5 ao trabalho previamente realizado com extratos orgânicos de áreas sob influência do complexo petroquímico.

## **2. ÁREA DE ESTUDO**

A cidade de Triunfo (29°56'36"S e 51°43'05"W), no sul do Brasil, possui uma área de 819.087 km<sup>2</sup> com aproximadamente 30.159 habitantes (IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2021). O município possui características rurais, urbanas e industriais, sob a influência de um complexo industrial petroquímico (3600 hectares). A área industrial é composta por seis empresas de compostos petroquímicos primários e secundários que produzem 1.252 toneladas de etano anualmente, além de outros produtos petroquímicos como benzeno, tolueno e xileno. As atividades de agricultura e silvicultura na cidade ocupam 39,7% e 23,5%, respectivamente, do território com diversos cultivos em pequenas parcelas, principalmente de arroz (60,9%) e milho (10,8%). (FEPAM, 2010; SEBRAE, 2020). O

município está entre as três cidades do estado com maior índice potencial de poluição industrial (FEE, 2012).

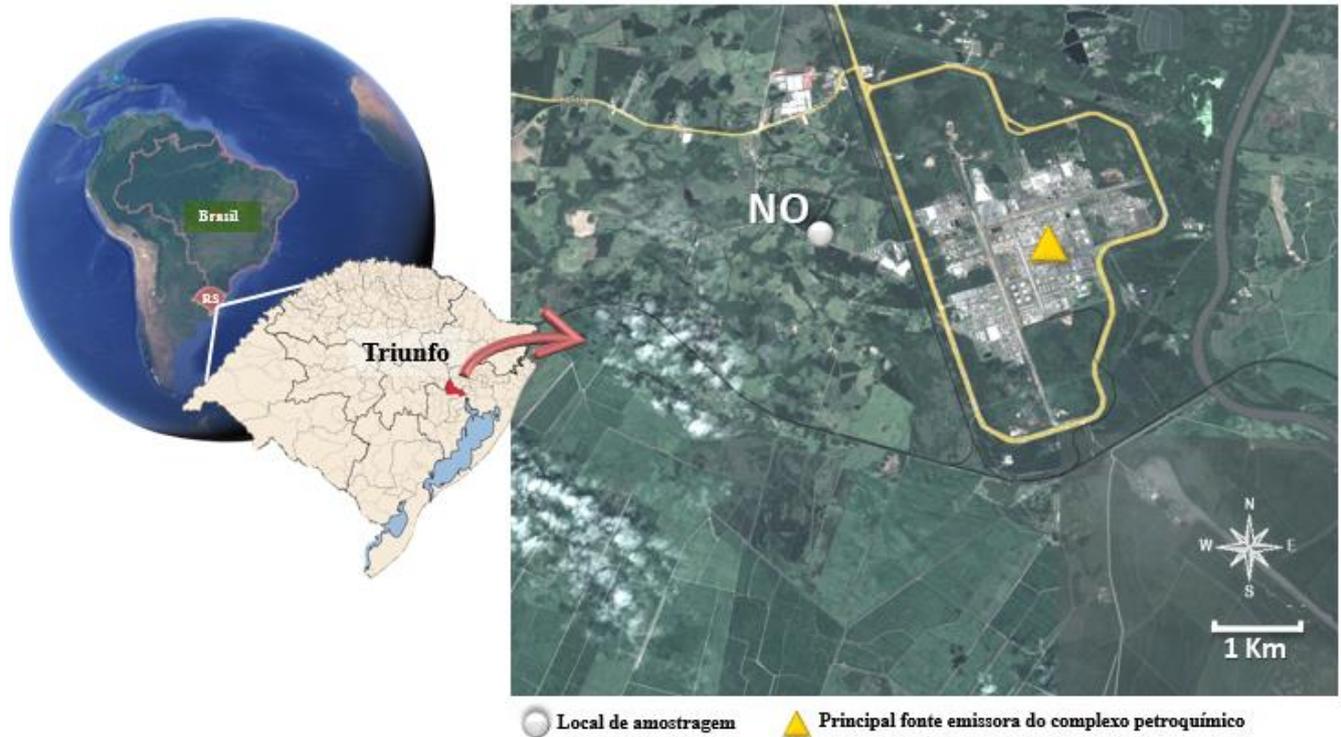
A presença de metais é também considerada significativa em áreas industriais, sendo que o V, Fe e Ni compõem os metais mais abundantes presentes no petróleo (Caumette et al., 2009), somado a presença de Zn, Cu e Fe em área de refinaria de petróleo (Palacio et al., 2016b), tem sido considerado um marcador do impacto de emissões atmosféricas de atividades da indústria de petróleo (Garcia; Mirlean; Baisch, 2010).

O local de amostragem de material particulado foi selecionado, previamente investigado quanto ao potencial genotóxico de compostos orgânicos no MP atmosférico (FEPAM, 2010; Lemos et al., 2016; Lemos et al., 2020). A partir de uma fonte de emissões atmosféricas industrial petroquímica, foi selecionado um local na área de maior deposição de MP<sub>2,5</sub> com base em estudo de modelagem de dispersão de poluentes a partir da fonte emissora (ISC\_ST3, Software ISCAERMOD View 5.8.0, Lakes Environment). O local foi posicionado na primeira direção preferencial dos ventos da região, distante a 2,5 Km da fonte emissora, sendo nomeado de acordo com sua orientação em relação a esta fonte (NO- Noroeste). Este local está inserido em área urbano-rural, caracterizada por agricultura de pequeno porte, ocupando 39,7% da área do município e silvicultura em 23,5% do total do município (Figura 1).

No estudo de Lemos et al. (2016), foi avaliada a fração orgânica do material particulado MP<sub>2,5</sub>, através de diferentes biomarcadores de genotoxicidade. Os resultados obtidos em três biomarcadores in vitro (ensaio *Salmonella*/microssoma, ensaio cometa e teste de micronúcleo) apontaram pior qualidade do ar no local posicionado na primeira direção preferencial dos ventos, a partir da fonte industrial.

Em uma segunda etapa desta pesquisa, Lemos et al. (2020) realizaram o biomonitoramento em crianças de duas escolas públicas localizadas na primeira direção dos ventos, porém em diferentes distâncias (NO a 2,5 km e NOII a 35 km) do complexo

petroquímico. Amostras de sangue periférico e células esfoliadas da mucosa oral foram coletadas para realização do ensaio cometa e teste de micronúcleos, acompanhadas de análises do MP<sub>2,5</sub> com o ensaio *Salmonella*/microsoma. O local mais próximo do pólo petroquímico (NO) apresentou a pior qualidade do ar (Lemos et al., 2016; Lemos et al., 2020).



**Figura 1.** Localização do ponto de amostragem na área de estudo localizada no município de Triunfo, RS.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

O presente estudo visou analisar a citotoxicidade/genotoxicidade da fração solúvel em água de material particulado atmosférico inalável fino (MP<sub>2,5</sub>) em uma área sob impacto industrial e urbano/rural, nas diferentes estações climáticas.

#### 3.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o potencial mutagênico e citotóxico da fração solúvel de MP no ensaio *Salmonella*/microsoma;

- ✓ Comparar os efeitos citotóxicos/genotóxicos nas diferentes estações climáticas;
- ✓ Contribuir para o avanço nos parâmetros de investigação dos reflexos da poluição na saúde humana.

#### **4. ARTIGO CIENTÍFICO**

O artigo científico “*Atividade mutagênica da fração solúvel em água de MP2,5 em área sob impacto industrial e urbano/rural*”, a ser submetido à revista *Ecotoxicology and Environmental Safety*, foi desenvolvido a partir dos resultados obtidos neste trabalho.

O estudo investigou a potência mutagênica da fração solúvel em água de MP2,5 em área sob impacto industrial e urbano/rural no município de Triunfo, Rio Grande do Sul, Brasil.

### **ATIVIDADE MUTAGÊNICA DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁGUA DE MP2,5 EM ÁREA SOB IMPACTO INDUSTRIAL E URBANO/RURAL**

Lara Martins Prusch<sup>a,b</sup>, Andréia Torres Lemos<sup>a</sup>, Karoline Silva Zenato<sup>a,c</sup>, Livia Rozino<sup>a,c</sup>,  
Cristiane Silva da Silva<sup>a,b</sup>, Vera Maria Ferrão Vargas<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Mutagênese Ambiental, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),  
Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

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

<sup>c</sup>Programa Institucional de Bolsas de iniciação científica, Fundação Estadual de Proteção  
Ambiental, PIBIC/CNPq/FEPAAM

## Resumo

O Material Particulado (MP) é um poluente do ar associado a uma série de consequências adversas ao ambiente e à saúde humana, classificado como agente carcinogênico para humanos (grupo 1) pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC). Estudos avaliando MP<sub>2,5</sub> (partículas de tamanho aerodinâmico  $\leq 2,5 \mu\text{m}$ ) de diferentes áreas no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, apresentaram compostos mutagênicos em amostras consideradas dentro dos parâmetros permitidos pela legislação ambiental brasileira. Em nível mundial, poucos estudos têm avaliado a composição da fração solúvel em água (FSA) do MP e sua contribuição para o potencial genotóxico. Visando o entendimento desses poluentes, o presente estudo avaliou a FSA do MP<sub>2,5</sub> em área sob impacto industrial petroquímica e urbano/rural no ensaio *Salmonella*/microsoma pelo método de microssuspensão. As concentrações anuais e diárias de MP<sub>2,5</sub> observadas na área de estudo estavam dentro dos limites em vigor pela legislação brasileira ( $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  e  $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , respectivamente). Os resultados mostraram a presença de compostos mutagênicos em todas as amostras analisadas, ocorrendo variações nas diferentes estações do ano. Os valores de mutagênese direta (-S9) foram predominantes, sendo os mais elevados observados frente à linhagem TA97a ( $426,85 \pm 143,221 \text{ rev}/\text{m}^3$ ), que mede danos por erro no quadro de leitura do DNA, descrita como a linhagem *Salmonella* mais sensível a compostos metálicos. As respostas de mutagênese por substituição de pares de bases foram detectadas frente à linhagem TA102 ( $25,82 \pm 5,651 \text{ rev}/\text{m}^3$ ), por ensaios diretos, e indiretos ( $8,74 \pm 3,278 \text{ rev}/\text{m}^3$ ), gerados por metabólitos induzidos pela fração de metabolização hepática *in vitro* (+S9mix). Esta linhagem é sensível a estresse oxidativo, o que sugere a presença de compostos metálicos na FSA investigada. Os resultados de mutagenicidade da FSA obtidos no ensaio *Salmonella*/microsoma corroboram com as recomendações da IARC e OMS quanto à inexistência de limites seguros para exposição ao MP, mostrando a necessidade de

esforços para reduzir essas partículas. A integração destas informações poderá auxiliar na escolha de estratégias mais adequadas de controle da poluição.

Palavras-chave: Material Particulado, metais pesados, fração solúvel em água, genotoxicidade, *Salmonella*/microssoma.

## **1. Introdução**

A integridade do ar é considerada um dos quesitos primordiais para saúde humana e para o meio ambiente (WHO, 2021; Chen; Kan, 2008). A qualidade do ar sofre influência de fatores naturais e antrópicos, condições atmosféricas e geográficas e emissões de diversas fontes, que podem persistir no ambiente, interferindo no fluxo de energia e nutrientes da cadeia biológica. A poluição do ar é reconhecida como um desafio, gerando efeitos adversos ao ambiente e à saúde pública global, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (WHO, 2021; Chen; Kan, 2008). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), houve aumento de 8% nos níveis anuais de partículas atmosféricas no planeta em período de cinco anos (WHO, 2016). Estima-se que milhões de mortes ao ano estão associadas à poluição ambiental, sendo o material particulado atmosférico (MP) responsável pela morte prematura de 3,1 milhões de pessoas em escala global, sobretudo nos países em desenvolvimento, onde os níveis de particulados no ar são mais elevados (Shah et al., 2013).

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), embasada em pesquisas de diferentes países, classificou a poluição atmosférica, em especial o MP, como agente carcinogênico (grupo 1) para humanos, sem limites de concentração seguros (IARC, 2016). O MP consiste de uma mistura complexa de substâncias orgânicas e inorgânicas que se mantém em suspensão na atmosfera, sendo classificado pelo seu tamanho aerodinâmico (Grantz; Garner; Johnson, 2003; Esworthy, 2013). Os efeitos biológicos adversos associados ao MP são inversamente proporcionais ao seu tamanho (Brook et al., 2010; Kim; Kabir; Kabir, 2015). As

partículas  $\leq 2,5\mu\text{m}$  compreendem a fração inalável do ar, capazes de alcançar os alvéolos durante a respiração. Essas partículas podem permanecer em suspensão por dias ou semanas, sendo transportadas por longas distâncias (WHO, 2021).

No Brasil, as diretrizes de qualidade do ar estabelecem valores de concentração entre  $25\mu\text{g}/\text{m}^3$  e  $10\mu\text{g}/\text{m}^3$  (período de 24h e média anual, respectivamente). Esses valores, contudo, estão atualmente em desacordo com a OMS, que revisou suas Diretrizes de Qualidade do Ar, tornando-as mais rigorosas. Esta revisão alerta que exceder os novos limites traz riscos significativos para a saúde e que a adoção destes pode evitar 80% das mortes relacionadas ao MP2,5 no mundo (WHO, 2021).

A associação de pesquisas com biomarcadores detecta respostas à exposição, efeito ou suscetibilidade dos indivíduos aos agentes químicos e/ou outros estressores ambientais evidenciadas por alterações celulares, bioquímicas ou moleculares medidas em tecidos, células ou fluídos (Van der Oost; Beyer; Vermeulen, 2003). Os biomarcadores de genotoxicidade são indicadores precoces de contaminação e utilizados para análises de risco relativo ambiental. O ensaio *Salmonella*/microsoma é o método mais amplamente empregado para identificar atividade mutagênica em amostras ambientais (Claxton; Woodall, 2007; Claxton; Umbuzeiro; De Marini, 2010). O teste associa à célula bacteriana, geneticamente modificada, um sistema de metabolização hepática de ratos in vitro (S9 mix). A resposta neste ensaio permite a previsão de riscos a organismos de diferentes classes biológicas quanto à interação de estressores químicos ou seus metabólitos com a estrutura do DNA (Vargas, 2003; Claxton; Matthews; Warren, 2004). O ensaio possui linhagens teste *Salmonella* sensíveis a diferentes classes de compostos permitindo definir danos moleculares clássicos, como a linhagem TA102, que detecta substituição de pares de bases associada à indução de danos oxidativos e as linhagens TA98 e TA97a, que marcam erros no quadro de leitura do DNA, sendo a segunda descrita como sensível à metais (Maron; Ames, 1983; Pagano; Zeiger, 1992; Mortelmans; Zeiger, 2000).

Em nível mundial, a maioria dos estudos sobre o potencial genotóxico do MP tem avaliado a fração de compostos orgânicos extraíveis. Poucos estudos têm investigado a genotoxicidade da fração solúvel em água (FSA) associada ao MP (Claxton; Woodall, 2007; Lemos et al., 2012; Claxton, 2015; Palacio et al., 2016a; Palacio et al., 2016b). No Brasil, apenas três estudos analisaram este tema (Lemos et al., 2012; Palacio et al., 2016a, 2016b) observando correlação positiva entre a concentração de metais hidrossolúveis e a resposta genotóxica em MP. Metais ou compostos organometálicos no MP oriundos de fontes antropogênicas podem estar presentes na FSA em formas altamente móveis e, portanto, potencialmente biodisponíveis (Vargas, 2003; Quitério et al., 2004; Palacio et al., 2016a, 2016b), influenciando nas funções biológicas.

Estudos realizados no Rio Grande do Sul utilizando biomarcadores de genotoxicidade avaliando extratos orgânicos de MP<sub>2,5</sub> e MP<sub>10</sub> de áreas urbanas, industriais e mistas (Brito et al., 2013; Coronas et al., 2016; Lemos et al., 2012, Lemos et al., 2016; Silva et al., 2015) mostraram a presença de compostos mutagênicos em amostras dentro dos parâmetros permitidos pela legislação brasileira. Considerando que os padrões de qualidade do ar não são suficientes para garantir a saúde das populações expostas, é necessária a adoção de medidas de controle de poluição atmosférica. Assim, a investigação da FSA do MP<sub>2,5</sub>, sinalizando em especial os compostos metálicos, visa entender o potencial genotóxico desses poluentes em sua forma biodisponível. Desse modo, o presente estudo visou analisar a citotoxicidade/genotoxicidade da fração solúvel em água de MP<sub>2,5</sub>, utilizando o teste *Salmonella*/microsoma, em uma área sob impacto industrial e urbano/rural.

## **2. Metodologia**

### **2.1. Área de estudo**

O trabalho foi desenvolvido em Triunfo, RS em área sob influência industrial e urbano-rural (29°56'36" S e 51°43'05" W). O município tem uma área de 819,087 km<sup>2</sup> e está entre as

três cidades do estado com maior índice de exposição a poluentes industriais (Lemos et al., 2020). No presente estudo, o local de amostragem selecionado, foi previamente investigado quanto ao potencial genotóxico de compostos orgânicos no MP atmosférico (Lemos et al., 2016; Lemos et al., 2020), com base em estudo de modelagem de dispersão de poluentes a partir de uma fonte emissora (ISC\_ST3, Software ISCAERMOD View 5.8.0, Lakes Environment). O local foi posicionado na primeira direção preferencial dos ventos da região, distante a 2,5 km dessa fonte, sendo nomeado de acordo com sua orientação em relação a esta (NO- Noroeste). Esta estação de amostragem está inserida em área urbano-rural caracterizada por atividades de agricultura de pequeno porte, ocupando 39,7% da área do município e de silvicultura com 23,5% do total do município (29°41'44" S e 51°41'19" W) (Fig. 1).

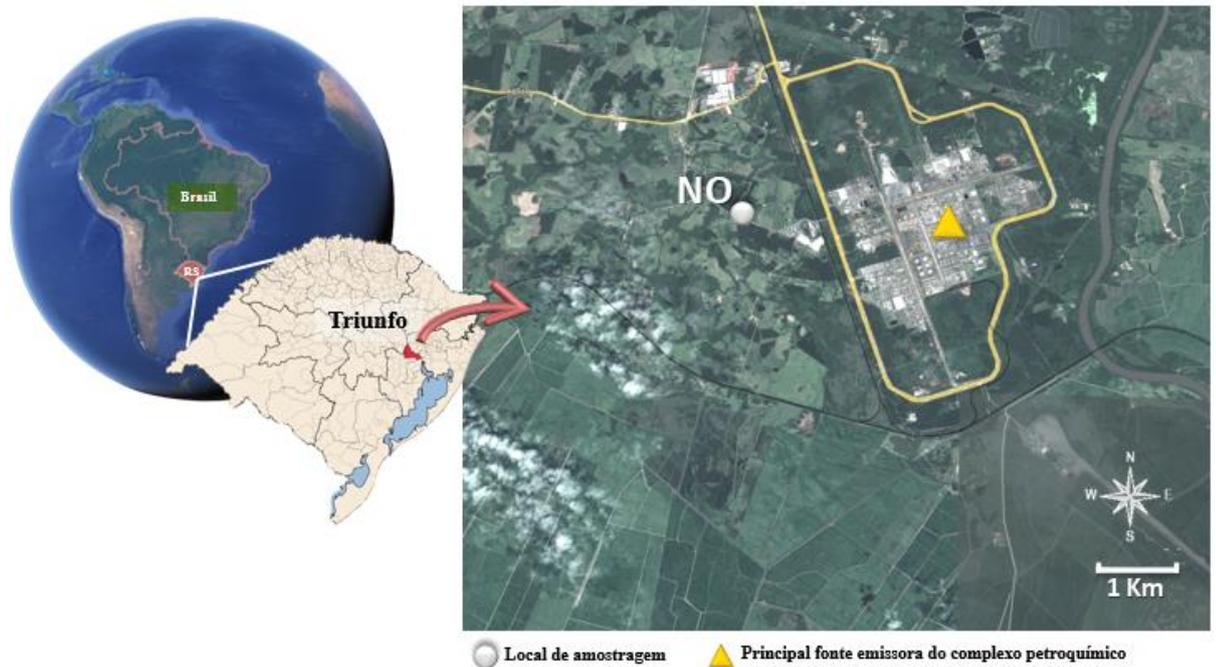


Fig 1: Local de amostragem localizado no município de Triunfo, RS, Brasil, em área sob impacto industrial e urbano rural. NO: noroeste.

## 2.2. Amostragem de material particulado

As amostras de partículas finas inaláveis (MP<sub>2,5</sub>) foram coletadas com filtros de membrana de teflon (TX40HI20WW, 254 203 mm) em amostradores para grandes volumes de ar (AGV MP2.5 1200/CCV ‘Thermo Environmental Instruments’) operados a uma faixa de fluxo de 1,3-1,5m<sup>3</sup>/minuto. Estas amostragens foram realizadas em estudo anterior (Lemos et

al., 2016), sendo o MP coletado por 24h, semanalmente, em 2013, nas quatro estações climáticas. As concentrações de MP<sub>2,5</sub> foram expressas em unidades de mg/m<sup>3</sup> de ar amostrado (ABNT, 1997). Os filtros foram mantidos em freezer a -20°C até o momento dos ensaios.

### **2.3. Extração da fração solúvel em água**

A extração das substâncias hidrossolúveis adsorvidas no material particulado dos filtros amostrados foi realizada em micro-ondas MARS 6™, utilizando 10 ml de água ultrapura (18,2MU) ('Purelab Ultra SC MK2 Elga, WS- Inglaterra') para cada 1/8 de filtro, posteriormente agrupados em um pool por estação do ano. O equipamento foi ajustado para uma potência de 1000 W e uma temperatura de 100°C por 10 min com uma aceleração de aquecimento por 10 min (Método 3546 EPA) (USEPA, 2022). Após resfriamento, as amostras foram reunidas, homogeneizadas, esterilizadas em membranas (0,45µm) (Billerica, MA-USA), distribuídas em alíquotas e levadas ao freezer (-20°C) até o ensaio. Uma amostra de filtro branco foi também analisada.

### **2.4. Rendimento da extração inorgânica**

A fim de calcular o rendimento da extração, foi separado 1ml do pool de extratos da amostra pesado em vidro de relógio, obedecendo às seguintes etapas: 1) estabilizar o vidro de relógio vazio em dessecador durante 15 minutos; 2) secar em estufa a 100°C por 30 minutos; 3) estabilizar novamente em dessecador por 15 minutos; 4) pesar em balança analítica de 6 casas; 5) Acrescentar 1ml do extrato no vidro de relógio e secar em estufa a 100°C por cerca de 1 hora; 6) Estabilizar o vidro com o extrato seco em dessecador por 15 minutos; 7) Pesar novamente em balança analítica.

O valor da massa extraída (g) foi obtido subtraindo-se o valor final do vidro e o valor inicial ( $P_2 - P_1 = \Delta P$ ). O valor de  $\Delta P$  foi multiplicado por 100% e dividido pelo  $\Sigma P/8$  (somatório da massa total do pool/8) para obter o rendimento da extração em %. Os valores de rendimento de extração obtidos foram de: 0,86 % (pool de outono), 3,12 % (pool de inverno), 6% (pool de primavera) e 1,39% (pool de verão).

## 2.5. Avaliação mutagênica *in vitro*

A avaliação da atividade mutagênica dos extratos hidrossolúveis foi realizada através do ensaio *Salmonella*/microsossoma (Maron; Ames, 1983) pelo método de microssuspensão (Kado et al., 1986). Foram utilizados como biomarcadores respostas frente à linhagem que detecta substituição de pares de bases associada à danos oxidativos (TA102) e duas linhagens que marcam erros no quadro de leitura (TA98 e TA97a) do DNA. Esta última é descrita como a mais sensível aos compostos metálicos (Pagano; Zeiger, 1992). Os ensaios foram realizados em triplicata, em ausência e presença de fração metabólica hepática *in vitro* (S9) (ratos *Sprague-Dawley* induzidos por Aroclor1254, Molttox S.A., USA). Sete concentrações de amostra (7,5; 15; 30; 60; 120; 240 e 480 µl/placa) foram incubadas com 100 µl da cultura bacteriana ( $1 \times 10^{10}$  células/ml) por um período por 90 min, a 37° C com agitação. Como controles negativos foram utilizados água ultrapura estéril e meio nutriente líquido para titulação de crescimento da linhagem teste; como controles positivos 4NQO (4-óxido de nitroquinoleína 0,5 µg/placa - CASRN. 56-57-5, Sigma Chemical Company), 2AF (2-aminofluoreno, em 1,0 µg/placa - CASRN. 153-78-6, Sigma Chemical Company) e luz UV por 2 segundos. Após 72 horas de incubação a 37° C, as colônias revertentes foram contadas manualmente para estimar a atividade mutagênica.

A citotoxicidade das amostras foi determinada a partir do teste de sobrevivência, realizado simultaneamente aos testes de mutagenicidade. Uma suspensão celular bacteriana ( $1-2 \times 10^{10}$  células mL<sup>-1</sup>) foi incubada a 37°C por 90 min (com S9mix, tampão fosfato 0,1 M ou amostra) e, posteriormente, diluída em tampão fosfato (pH = 7,4) para alcançar a concentração de  $1-2 \times 10^2$  células mL<sup>-1</sup>. A seguir, a cultura bacteriana foi semeada em ágar nutriente e incubada por 72h a 37°C. Após esse período, as colônias sobreviventes foram contadas manualmente.

## 2.6. Análise de dados

As amostras foram consideradas mutagênicas frente a ANOVA ( $P \leq 0,05$ ) e curva dose-resposta positiva significativa ( $P \leq 0,05$ ), avaliadas pelo *Software* Salanal (Salmonella Assay Analysis, v. 1.0, Research Triangle Institute, NC, USA), selecionando os modelos de regressão linear ou Bernstein (Bernstein et al., 1982), sendo utilizado o modelo Lintox quando este foi configurado como o melhor modelo de regressão para os dados avaliados. O potencial mutagênico foi expresso em número de revertentes por  $\mu\text{g}$  de extrato (rev/ $\mu\text{g}$ ) e revertentes por metro cúbico de ar amostrado (rev/ $\text{m}^3$ ).

As amostras foram consideradas citotóxicas quando apresentaram sobrevivência inferior a 60% em relação ao controle negativo (Vargas et al., 1993).

## 3. Resultados e discussão

As médias anuais de MP2,5 observadas na área do presente estudo ( $9,75 \pm 3,84$ ) (Lemos et al., 2016) estavam abaixo dos valores estabelecidos como PF pela legislação brasileira BRASIL, 2018) ( $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ), porém acima dos valores propostos pela OMS em 2021 ( $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) (WHO, 2021). A tabela 1 apresenta os dados sobre as concentrações de MP2,5 dos filtros coletados. O pool de amostras de outono apresentou as maiores concentrações médias diárias de MP2,5 ( $15,51 \pm 6,58 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ). Todos os pools amostrados apresentaram valores de concentrações médias diárias dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira ( $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ), porém com valores que extrapolam as recomendações da OMS ( $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ).

**Tabela 1:** Dados sobre as concentrações de MP<sub>2,5</sub> dos filtros coletados em área sob influência industrial e urbano/rural.

Amostragem	Data de amostragem	C MP <sub>2,5</sub>	C média MP <sub>2,5</sub> do pool
		( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
Verão	15/02/13, 21/02/13, 27/02/13, 05/03/13, 11/03/13, 17/03/13	6,52 – 5,28 – 9,1 – 8,18 – 5,53 – 4,42	6,50 ± 1,81
Outono	23/03/13, 29/03/13, 28/04/13, 10/05/13	12,62 – 7,59 – 20,38 – 21,46	15,51 ± 6,58
Inverno	08/08/13, 14/08/13, 20/08/13, 19/09/13	13,56 – 3,75 – 14,04 – 11,31	10,66 ± 4,76
Primavera	25/09/13, 01/10/13, 07/10/13, 13/10/13, 25/10/13	3,53 – 8,34 – 8,52 – 5,7 – 7,77	6,33 ± 2,19

Estações climáticas, datas de coletas, concentrações e concentrações médias diárias  $\pm$  o desvio padrão de MP<sub>2,5</sub> dos pools. Limite de concentração diário: 25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ; Limite de concentração anual: 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (BRASIL, 2018); Recomendações da OMS diário: 15  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ; anual 5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (WHO, 2021).

Estudos realizados anteriormente no local NO (Lemos et al., 2016) observaram efeito citotóxico, mutagênico e/ou genotóxico em todas as amostras, embora estas estivessem abaixo dos valores estabelecidos pelas diretrizes da OMS no período da pesquisa (WHO, 2005), definidos em 25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  e 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , para período de 24h e para a média anual, respectivamente. Esses padrões foram adotados no país e permanecem em vigor, devendo ser alcançados de forma escalonada como Padrões Finais (PF) (BRASIL, 2018).

Contudo, esses padrões (WHO, 2005) mostraram a necessidade de esforços para reduzir as partículas atmosféricas, consideradas pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como agente carcinogênico para humanos, sem limites de concentração seguros (IARC, 2016). Os efeitos biológicos adversos da exposição ao MP têm sido descritos na literatura

internacional, levando a OMS adotar parâmetros mais restritos (WHO, 2021), recomendando redução nos limites diários para MP<sub>2,5</sub> em 15 µg/m<sup>3</sup> e tolerância de 5 µg/m<sup>3</sup> para média anual, alertando que exceder os novos níveis das diretrizes de qualidade do ar traz riscos significativos para a saúde.

A regulamentação brasileira é ainda uma ferramenta ineficiente para proteger a saúde pública e o ambiente contra os efeitos adversos desses poluentes (Lippmann, 2012). Em relação às concentrações de MP<sub>2,5</sub> ou MP<sub>10</sub>, deve ser considerado que os compostos responsáveis pelos efeitos genotóxicos do MP nem sempre estão associadas à concentração total de MP (Palacio et al., 2016a), podendo constituir uma pequena parte desta. Heal et al., 2005, sugerem que seria mais apropriado focar em políticas que levam à redução de poluentes, independente de concentrações absolutas definidas em relação a algum valor arbitrário.

Os resultados de mutagenicidade da fração solúvel em água do MP<sub>2,5</sub> no ensaio *Salmonella*/microsoma são apresentados nas tabelas 2 e 3, expressos em rev/m<sup>3</sup> e em rev/µg, respectivamente. Os resultados mostraram a presença de compostos mutagênicos em todas as amostras analisadas, ocorrendo variações na resposta das diferentes estações do ano. Com exceção do teste realizado com a linhagem TA102 no verão, todas as respostas foram observadas na ausência de S9mix, indicando a presença de compostos de ação direta, ou seja, que decrescem sua atividade mutagênica em presença de metabolização hepática.

Os maiores resultados observados nas respostas mutagênicas foram no outono, detectados nas três linhagens testadas (TA97a, TA98 e TA102) em ausência de S9. Desta forma, os mutágenos podem causar diferentes ações no material genético diretamente e ainda elevar danos oxidativos. Os valores mais elevados observados nessa estação foram frente a linhagem TA97a ( $27,61 \pm 9,264$  rev/µg;  $426,85 \pm 143,221$  rev/m<sup>3</sup>), descrita como a mais sensível a metais (Pagano; Zeiger, 1992). No entanto esta alta potência mutagênica foi restrita a estação do

outono. Ainda se destacaram os valores frente a linhagem TA102 ( $1,62 \pm 0,594$  rev/ $\mu$ g;  $25,04 \pm 9,183$  rev/ $m^3$ ) sensível a estresse oxidativo.

De forma similar, Lemos et al. (2016) investigando este mesmo local e período de estudo puderam confirmar a alta potência mutagênica, na linhagem TA98 (+/-S9), frente a diferentes classes de compostos orgânicos. No entanto, nos dados atuais analisando a FSA a resposta desta linhagem apenas foi para mutágenos diretos com valores reduzidos de  $0,30 \pm 0,108$  rev/ $m^3$ . Esse período corresponde a um episódio de vazamento de benzeno e de hidrocarboneto observado no complexo petroquímico, que pode ter influenciado nas respostas obtidas para mutagenicidade, atribuído à presença de hidrocarbonetos, pois o benzeno não permanece nas amostras e o teste *Salmonella*/microssoma não é sensível ao composto (Lemos et al., 2016). Desta forma, compostos biodisponíveis de outra natureza, provavelmente substâncias metálicas presentes na FSA também foram observadas. A presença de respostas na linhagem TA102, sensível a estresse oxidativo, direciona para indução por compostos metálicos.

**Tabela 2:** Mutagênese e citotoxicidade de extratos da FSA de MP2,5 em áreas sob influência industrial e urbano-rural expressos em rev/ $m^3$ .

Pool	TA97a		TA98		TA102		Citotoxicidade
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
Verão	ns	ns	ns	ns	ns	$8,74 \pm 3,278$	nc
Outono	$426,85 \pm 143,221$	ns	$0,30 \pm 0,108$	ns	$25,04 \pm 9,183$	ns	nc
Inverno	ns	ns	$0,42 \pm 0,074$	ns	ns	ns	nc
Primavera	ns	ns	ns	ns	$25,82 \pm 5,651$	ns	nc

Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de revertentes por  $m^3$  de amostras positivas e indicativas de atividade mutagênica. Controle negativo, expresso em revertentes/placa (água ultrapura - 100 $\mu$ l):  $139,0 \pm 5,56$  (TA97a -S9);  $177,88 \pm 20,03$  (TA97a +S9);  $18,16 \pm 6,33$  (TA98 -S9);  $29,0 \pm 4,63$  (TA98 +S9);  $283,7 \pm 71,67$  (TA102 -S9);  $256,7 \pm 103,97$  (TA102 +S9). Controle positivo expresso em revertentes/placa (4NQO - 0,5  $\mu$ g/placa):  $993,8 \pm 149,94$  (TA97a -S9);  $62,4 \pm 15,29$  (TA98 -S9); (UV - 2s):  $2377 \pm 748,30$  (TA102 -S9);  $2148,33 \pm 182,48$  (TA102 +S9); (2AF - 1  $\mu$ g/placa):  $404,57 \pm 171,27$  (TA97a +S9);  $134,2 \pm 14,44$  (TA98 +S9). ns: não significativo. nc: não citotóxico.

**Tabela 3:** Mutagenicidade de extratos inorgânicos de MP<sub>2,5</sub> em áreas sob influência industrial e urbano-rural expressos em rev/ $\mu$ g.

Amostragem	TA97a		TA98		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Verão	ns	ns	ns	ns	ns	<sup>a</sup> 1,35 $\pm$ 0,506
Outono	<sup>a</sup> 27,61 $\pm$ 9,264	ns	<sup>b</sup> 0,02 $\pm$ 0,007	ns	<sup>a</sup> 1,62 $\pm$ 0,594	ns
Inverno	ns	ns	<sup>b</sup> 0,04 $\pm$ 0,007	ns	ns	ns
Primavera	ns	ns	ns	ns	<sup>c</sup> 3,82 $\pm$ 0,836	ns

Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de revertentes por  $\mu$ g de amostras positivas para atividade mutagênica. ns: não significativo. Modelos de regressão no programa Salanal: <sup>a</sup>Modelo de Bernstein; <sup>b</sup>Modelo Linear; <sup>c</sup>Modelo lintox2; nc: não citotóxico. Controles negativos e positivos (revertentes/placa) são mostrados no rodapé da Tabela 2.

O segundo valor mais elevado de atividade mutagênica foi observado na primavera frente à linhagem TA102 -S9 (3,82  $\pm$  0,836 rev/ $\mu$ g; 25,82  $\pm$  5,651 rev/m<sup>3</sup>). Já no verão, também foi observada atividade mutagênica frente à linhagem TA102, mas induzida pela fração S9 (1,35  $\pm$  0,506 rev/ $\mu$ g; 8,74  $\pm$  3,278 rev/m<sup>3</sup>), além de menores valores de indução mutagênica frente à linhagem TA98 - S9. Da mesma forma valores mais baixos foram observados frente a esta linhagem na estação de inverno.

Uma gama de fatores, incluindo atividades antrópicas e condições meteorológicas, pode influenciar na composição química do MP. No inverno, por exemplo, episódios de inversões térmicas são frequentes, em que o ar quente forma uma camada sobre o ar frio e os poluentes ficam presos perto do nível do solo, de modo que não se dispersem (Palacio et al., 2016a).

Lemos et al., 2012 avaliando a mutagenicidade de MP e PTS de áreas urbano-industriais em área de influência de refinaria de petróleo no município de Rio Grande, RS pelo ensaio *Salmonella*/microsoma, observaram respostas negativas para mutagênese de extratos aquosos de MP<sub>2,5</sub>, porém a citotoxicidade foi detectada em 50% das amostras. As maiores concentrações médias de MP<sub>2,5</sub> foram observadas na primavera, sendo identificada a presença

de metais biodisponíveis como Al, Fe, Zn, Cu, V e Ni sendo o Zinco o elemento que apresentou as maiores concentrações em amostras de MP2,5. De modo semelhante, Palacio et al., (2016b) observaram atividade mutagênica pelo ensaio *Salmonella*/microssoma frente à linhagem TA98 (-S9/+S9) em amostras de extratos solúveis em água de MP10 correlacionada com a presença de metais como Ni, Cu, Zn, Fe, Mg e V.

As partículas de MP2,5 são constituídas principalmente de metais e hidrocarbonetos (De Kok et al., 2006) e estudos toxicológicos avaliam o teor de metal (particularmente metal solúvel em água) como um possível componente nocivo do MP (Shuster-Meiseles et al., 2016; Wiseman, 2015). Nos últimos anos, aumentaram o número de investigações que buscam compreender a relação entre a composição química do MP e seus efeitos toxicológicos, porém estudos sobre o efeito dessa composição e o potencial mutagênico de MP2,5 são recentes no Brasil (Brito et al., 2013; Coronas et al., 2016; Lemos et al., 2012; Silva et al., 2015; Lemos et al., 2016).

Na investigação do potencial mutagênico de compostos orgânicos Lemos et al., (2016) ainda detectou a presença de nitrocompostos e aminas aromáticas, somando as linhagens *Salmonella* tradicionais, outro grupo de linhagens marcadoras específicas (YG1021 e YG1024). A combinação destas três abordagens, compostos orgânicos tipo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, nitrocompostos e aminas aromáticas, mostraram a complexidade da mistura do MP desta região (Watanabe et al., 1990).

Em nível mundial, a maioria dos estudos de genotoxicidade do MP avaliou a fração orgânica. No entanto, poucas investigações determinaram os efeitos genotóxicos da fração solúvel em água (FSA) e dos metais de transição associados ao MP (Claxton e Woodall, 2007; Lemos et al., 2012; Palacio et al., 2016a, 2016b; Claxton, 2015). No Brasil, apenas três estudos analisaram esse tema: Lemos et al. (2012) mostraram a presença de metais tóxicos em MP2,5 no sul do Brasil, enquanto Palacio et al. (2016a, 2016b) observaram correlação positiva entre a

concentração de metais hidrossolúveis e a resposta genotóxica em MP10 no estado de São Paulo. Os achados do presente estudo somam informações com dois destes estudos brasileiros, priorizando áreas com influência de indústrias petroquímicas e urbano residenciais, registrando a presença de metais biodisponíveis na fração aquosa investigada (Lemos et al., 2012; Palacio et al., 2016b).

#### **4. Conclusão**

Estratégias de regulação, incluindo a caracterização química da fração solúvel em água do material particulado e avaliação da sua potência genotóxica, bem como fatores climáticos que podem estar influenciando nesta potência, pode ser uma ferramenta mais eficiente para prever efeitos adversos à saúde e ao meio ambiente do que os critérios atualmente em vigor para MP, que consideram a concentração total de partículas. Diversos autores relataram a presença de metais em MP ao redor do mundo, porém a genotoxicidade do MP avaliada apenas por análise química contém algumas limitações. Essa abordagem com foco no teor total de metais em amostras ambientais carece de informações sobre sua biodisponibilidade, mobilidade ou toxicidade, não podendo prever efeitos biológicos, ações antagônicas ou sinérgicas nessas misturas de contaminantes.

Áreas impactadas por diferentes atividades antrópicas mostram danos genotóxicos em diversos estudos, possivelmente devido às fontes de emissão envolvidas, destacando-se as atividades industriais e urbanas. Embora as concentrações de MP<sub>2,5</sub> observadas estejam dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2018), ainda estão abaixo das atuais diretrizes estabelecidas pela OMS, para exposição diária (WHO, 2021). Os resultados de mutagenicidade da FSA de MP<sub>2,5</sub> obtidos no ensaio *Salmonella*/microsoma realizado no presente estudo corroboram com as recomendações da IARC e OMS quanto à inexistência de limites seguros para exposição ao MP, mostrando a necessidade de esforços para reduzir essas partículas.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado cedida a Lara Martins Prusch e ao Programa Institucional de Bolsas de iniciação científica, Fundação Estadual de Proteção Ambiental, PIBIC/CNPq/FEPAM pela bolsa de iniciação científica da aluna de iniciação científica Priscila Medeiros. Agradecimentos também ao grupo de amostragem da FEPAM, pelas coletas realizadas.

## 5. Referências

ABNT, 1997. ABNT-NBR-9547: Material particulado em suspensão no ar ambiente Determinação de concentração total pelo método do amostrador de grande volume. Associação Brasileira de Normas Técnicas, Rio de Janeiro, p. 14;

BERNSTEIN, L., Kaldor, J., McCann, J., & Pike, M. C. (1982). An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 97(4), 267–281. doi:10.1016/0165-1161(82)90026-7;

BRASIL, CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução nº 491, de 19 de novembro de 2018. Dispõe sobre padrões de qualidade do ar. Disponível em:<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=21/11/2018&jornal=515&pagina=155&totalArquivos=178>. Acesso em: 23 /07/ 2020;

BRITO, K.C.T., Lemos, C.T., Rocha, J.A.V., Mielli, A.C., Matzenbacher, C., Vargas, V.M.F., 2013. Comparative genotoxicity of airborne particulate matter (PM2.5) using Salmonella, plants and mammalian cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 94, 14–20. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.04.014;

BROOK, R. D., Rajagopalan, S., Pope, C. A., Brook, J. R., Bhatnagar, A. Diez-Roux, A. V. (2010). Particulate Matter Air Pollution and Cardiovascular Disease: An Update to the

Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 121(21), 2331–2378.  
doi:10.1161/cir.0b013e3181d8e1;

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;

CLAXTON, L.D., Umbuzeiro, G.A, DeMarini, D. 2010. The Salmonella Mutagenicity Assay: The Stethoscope of Genetic Toxicology for the 21st Century. *Environ. Health Perspect.* 118 (11), 1515-1522;

CLAXTON, L. D. (2015). The history, genotoxicity, and carcinogenicity of carbon-based fuels and their emissions: Part 5. Summary, comparisons, and conclusions. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 763, 103–147. doi:10.1016/j.mrrev.2014.10.001;

CHEN, B., & Kan, H. (2008). Air pollution and population health: a global challenge. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 13(2), 94–101. doi: 10.1007/s12199-007-0018-;

CORONAS, M.V., Rocha, J.A.V., Salvadori, D.M.F., Vargas, V.M.F., 2016. Evaluation of area contaminated by wood treatment activities: Genetic markers in the environment and in the child population. *Chemosphere* 144, 1207-1215;

DE KOK, T. M. C. M., Driee, H. A. L., Hogervorst, J. G. F., & Briedé, J. J. (2006). Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 613(2-3), 103–122. doi:10.1016/j.mrrev.2006.07.001;

ESWORTHY R. Air quality: EPA's 2013 changes to the particulate matter (PM) standard. *Congressional Research Service* 7-5700, n. R42934; 2013. p. 6;

GRANTZ, D.A., Garner, J.H.B., Johnson, D.W., 2003. Ecological effects of particulate matter. *Environ. Int.* 29, 213– 239;

HEAL, M.R., Hibbs, L.R., Agius, R.M., Beverland, I.J., 2005. Total and water-soluble trace metal content of urban background PM10, PM2.5 and black smoke in Edinburgh, UK. *Atmos. Environ.* 39, 1417e1430. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2004.11.026>;

IARC - International Agency for Research on Cancer, 2016. Agents Classified by the IARC Monographs. V. 1–117. [http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest\\_classif.php](http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php);

KADO, N.; Guirguis, G.; Flessel, C.; Chan, R.; Chang, K.; Wesolowski, J. Mutagenicity of fine (less than 2.5 microns) airborne particles: diurnal variation in community air determined by a Salmonella micro preincubation (microsuspension) procedure. *Environ. Mutagen.* v.8, p.53-66, 1986;

KIM, K.-H., Kabir, E., & Kabir, S. (2015). A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environment International*, 74, 136–143. doi:10.1016/j.envint.2014.10.005;

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., Lemos, C.T., Flores, A.N., Pantoja, E.O., Rocha, J.A., Vargas, V.M., 2016. Genotoxicity biomarkers for airborne particulate matter (PM2.5) in an area under petrochemical influence. *Chemosphere*. 159, 610-618. doi:10.1016/j.chemosphere;

LEMOS, A. T., de Lemos, C. T., Coronas, M. V., da Rocha, J. R., & Vargas, V. M. F. (2020). Integrated study of genotoxicity biomarkers in schoolchildren and inhalable particles in areas under petrochemical influence. *Environ. Res.*, 109443. doi:10.1016/j.envres.2020.109443;

LIPPMANN, M. Particulate matter (PM) air pollution and health: regulatory and policy implications. *Air Qual Atmos Health* 5, 237–241 (2012). <https://doi.org/10.1007/s11869-011-0136-5>;

MARON, D.M. & Ames, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, v. 11, p. 173-215, 1983;

MORTELMANS, K. & Zeiger, E., 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*. 455:29-60;

PAGANO, A. D., Zeiger, E. 1992. Conditions for detecting the mutagenicity of divalent metals in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mol. Mutag.* 19, 139-146;

PALACIO, I.C., Barros, S.B.M., Roubicek, D.A. 2016. Water-soluble and organic extracts of airborne particulate matter induce micronuclei in human lung epithelial A549 cells. *Mutat. Res.* 812, pp. 1-11a;

PALACIO, I. C., Oliveira, I. F., Franklin, R. L., Barros, S. B. M., & Roubicek, D. A. (2016). Evaluating the mutagenicity of the water-soluble fraction of air particulate matter: A comparison of two extraction strategies. *Chemosphere*, 158, 124–130. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.05.058b;

QUITÉRIO, S.L., Silva, C.R.S., Arbilla, G., Escaleira, V., 2004. Metals in airborne particulate matter in the industrial district of Santa Cruz, Rio de Janeiro, in an annual period. *Atmos. Environ.* 38, 321-331;

RAMÍREZ, O., Sánchez de la Campa, A. M., Sánchez-Rodas, D., & de la Rosa, J. D. (2020). Hazardous trace elements in thoracic fraction of airborne particulate matter: Assessment of temporal variations, sources, and health risks in a megacity. *Science of the Total Environment*, 710, 136344. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.136344;

SHAH ASV, Langrish JP, Nair H, McAllister DA, Hunter AL, Donaldson K, et al. Global association of air pollution and heart failure: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet* 2013;382:1039–48;

SHUSTER-Meiseles, T., Shafer, M. M., Heo, J., Pardo, M., Antkiewicz, D. S., Schauer, J. J. Rudich, Y. (2016). ROS-generating/ARE-activating capacity of metals in roadway particulate matter deposited in urban environment. *Environmental Research*, 146, 252–262. doi:10.1016/j.envres.2016.01.009;

SILVA, C.S., Rossato, J.M., Rocha, J.A.V., Vargas, V.M.F., 2015. Characterization of an area of reference for inhalable particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) associated with genetic biomonitoring in children. *Mutat Res.* 778, 44–55;

SRIMURUGANANDAM, B., & SHIVA NAGENDRA, S. M. (2012). Source characterization of PM<sub>10</sub> and PM<sub>2.5</sub> mass using a chemical mass balance model at urban roadside. *Science of The Total Environment*, 433, 8–19. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.05.082;

USEPA, METHOD 3546: microwave extraction. [S. l.], 14 jul. 2022. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/3546.pdf>. Acesso em: 07 jun. 2022;

VAN DER OOST, R., Beyer, J., Vermeulen N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Phar.* 13, 57-149;

VARGAS, V.M.F., 2003. Mutagenic activity as a parameter to assess ambient air quality for protection of the environmental and human health. *Mutat. Res.* 544, 313-319;

VARGAS, V. M. F., Motta, V. E. P., & Henriques, J. A. P. (1993). Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 319(1), 31–45. doi:10.1016/0165-1218(93)90028-c;

WALLEY, S.; COBHAM, P.; VINDEN, P. 1996a. Leaching of Copper, Chrome, Arsenic Treated Timber: Simulated Rainfall Testing (IRG/WP 96-50074). The International Research Group on Wood Preservation, Stockholm.a;

WALLEY, S.; COBHAM, P. VINDEN, P. 1996b. Preservative Leaching from Copper, Chrome, Arsenate Treated Timber: Towards na International Standard for Environmental Monitoring (IRG/WP 96-50076). The International Research Group on Wood Preservation, Stockholm.b;

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;

WEIS, J. S.; WEIS, P.Efects of chromated copper arsenate (CCA) pressure treated wood in the aquatic environment. *Ambio*, v. 24, p. 269-274, 1995;

WEIS, P.; WEIS, J. S.; GREENBERG, A.; NOSKER, T.J.Toxicity of construction materials in the marine environment: a comparison of chromated-copper-arsenate-treated wood and recycled plastic. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* v. 22, p. 99-106, 1992;

WHO - World Health Organization, 2016. Ambient air pollution: A global assessment of exposure and burden of disease. Geneva, Suiça. 131pgs. ISBN 9789241511353;

WHO- World Health Organization. 2021. WHO global strategy on health, environment and climate change: the transformation needed to improve lives and well-being sustainably through healthy environments. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. [https://www.who.int/phe/publications/global\\_strategy/en/](https://www.who.int/phe/publications/global_strategy/en/) (aces: 21/06/2021).

WISEMAN, C. L. S. (2015). Analytical methods for assessing metal bioaccessibility in airborne particulate matter: A scoping review. *Analytica Chimica Acta*, 877, 9–18. doi:10.1016/j.aca.2015.01.024.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho de dissertação foi embasado em estudo anterior no município de Triunfo, RS, em área sob impacto industrial e urbano/rural, que observou a presença de compostos com atividade mutagênica em extratos orgânicos de MP2,5, os quais estavam presentes em concentrações dentro dos valores estabelecidos pela atual legislação brasileira.

A etapa de pesquisa desenvolvida no presente trabalho teve como finalidade verificar a potência mutagênica da fração solúvel em água de amostras de MP2,5 da área previamente estudada. Para este propósito foram utilizados o ensaio *Salmonella*/microssoma, uma ferramenta útil, pois possui linhagens testadoras sensíveis frente a diversos compostos presentes em amostras ambientais. Essa característica do ensaio e sua aplicabilidade no monitoramento de áreas sob ameaça ambiental permite o diagnóstico da presença de poluentes mutagênicos/ou citotóxicos mesmo em baixas concentrações, servindo como alerta de contaminação ambiental e prevenção de danos ao patrimônio genético da fauna e da flora afetadas pelas atividades humanas.

Os resultados aqui apresentados mostram que a composição complexa do MP2,5 pode gerar efeitos genotóxicos, ressaltando a importância do uso de diferentes bioensaios para entender os efeitos dessas partículas de composição complexa. Os resultados obtidos corroboram as recomendações da IARC e OMS quanto à inexistência de limites seguros para exposição ao MP2,5, chamando atenção para os órgãos ambientais, dado que foi identificada atividade mutagênica em todas amostras analisadas, embora estas estivessem abaixo dos limites recomendados pela legislação em vigor, necessitando de revisões ou mesmo adoção dos novos parâmetros recomendados pelas agências internacionais, a fim de garantir a qualidade do ar, protegendo a saúde pública e o meio ambiente.

## 6. REFERÊNCIAS

ABNT, 1997. ABNT-NBR-9547: Material particulado em suspensão no ar ambiente Determinação de concentração total pelo método do amostrador de grande volume. Associação Brasileira de Normas Técnicas, Rio de Janeiro, p. 14.

ALVES, N. O. et al. Genotoxicity and composition of particulate matter from biomass burning in the eastern Brazilian Amazon region. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, n. 5, p. 1427–1433, jul. 2011.

AMES, B. N., Lee, F. D., & Durston, W. E. (1973). An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(3), 782–786. doi:10.1073/pnas.70.3.782

AMES, B N, McCann, J, and Yamasaki, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Netherlands: N. p., 1975. Web;

ARTAXO P., H. Storms, F. Bruynseels, R. Van Grieken, W. Maenhaut, J. Geophys. Res. 93 (1998) 1605;

ARTAXO P., *Environ. Pollut. Monit. Res. Program.* 53 (1988) 51;

BAIRD, C., 2002. *Química Ambiental*, second ed. Editorial Reverté S.A., Barcelona;

BELFIORE, N. M., Anderson, S.L., 2001. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutat. Res.*, 489, 97-122;

BEYERSMANN D, Hartwig A. *Arch Toxicol.* 2008 Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. 82(8):493-512;

BRADL, H. B., 2005. Sources and origins of heavy metals, in: Bradl, H. B. (Ed.), *Heavy Metals in the Environment*. Elsevier Ltd, Birkenfeld, pp. 1-27;

BRASIL, CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução nº 491, de 19 de novembro de 2018. Dispõe sobre padrões de qualidade do ar. Disponível

em:<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=21/11/2018&jornal=515&pagina=155&totalArquivos=178>. Acesso em: 23 /07/ 2020;

BRITO, K.C.T., Lemos, C.T., Rocha, J.A.V., Mielli, A.C., Matzenbacher, C., Vargas, V.M.F., 2013. Comparative genotoxicity of airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) using *Salmonella*, plants and mammalian cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 94, 14–20. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.04.014;

BROOK, R. D., Rajagopalan, S., Pope, C. A., Brook, J. R., Bhatnagar, A. Diez-Roux, A. V. (2010). Particulate Matter Air Pollution and Cardiovascular Disease: An Update to the Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 121(21), 2331–2378. doi:10.1161/cir.0b013e3181d8e1;

CAUMETTE G, Lienemann CP, Merdrignac I, Paucot H, Bouyssiere B, Lobinski R. Sensitivity improvement in ICP MS analysis of fuels and light petroleum matrices using a microflow nebulizer and heated spray chamber sample introduction. 80(2):1039-43. doi: 10.1016/j.talanta.2009.08.017;

CHEN, B., & Kan, H. (2008). Air pollution and population health: a global challenge. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 13(2), 94–101. doi: 10.1007/s12199-007-0018-;

CHENG, Z., Chen, L.-J., Li, H.-H., Lin, J.-Q., Yang, Z.-B., Yang, Y.-X., ... Zhu, X.-M. (2018). Characteristics and health risk assessment of heavy metals exposure via household dust from urban area in Chengdu, China. *Science of The Total Environment*, 619-620, 621–629. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.11.144;

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;

CLAXTON, L.D., Umbuzeiro, G.A, DeMarini, D. 2010. The Salmonella Mutagenicity Assay: The Stethoscope of Genetic Toxicology for the 21st Century. *Environ. Health Perspect.* 118 (11), 1515-1522;

CLAXTON, L. D. (2015). The history, genotoxicity, and carcinogenicity of carbon-based fuels and their emissions: Part 5. Summary, comparisons, and conclusions. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 763, 103–147. doi:10.1016/j.mrrev.2014.10.001;

CORONAS, M.V., Horn, R.C., Ducatti, A., Rocha, J.A.V., Vargas, V.M.F., 2008. Mutagenic activity of airborne particulate matter in 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, M.V., Rocha, J.A.V., Salvadori, D.M.F., Vargas, V.M.F., 2016. Evaluation of area contaminated by wood treatment activities: Genetic markers in the environment and in the child population. *Chemosphere* 144, 1207-1215;

DE KOK, T. M. C. M., Driee, H. A. L., Hogervorst, J. G. F., & Briedé, J. J. (2006). Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 613(2-3), 103–122. doi:10.1016/j.mrrev.2006.07.001;

DUAN, J., & Tan, J. (2013). Atmospheric heavy metals and Arsenic in China: Situation, sources and control policies. *Atmospheric Environment*, 74, 93–101. doi:10.1016/j.atmosenv.2013.03.03;

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.

ESWORTHY R. Air quality: EPA's 2013 changes to the particulate matter (PM) standard. Congressional Research Service 7-5700, n. R42934; 2013. p. 6;

FERNÁNDEZ ESPINOSA, A. J., Ternero Rodríguez, M., Barragán de la Rosa, F. J., & Jiménez Sánchez, J. C. (2002). A chemical speciation of trace metals for fine urban particles. *Atmospheric Environment*, 36(5), 773–780. doi:10.1016/s1352-2310(01)00534-9;

FU M, Zheng F, Xu X, Niu L. Advances of study on monitoring and evaluation of PM2.5 pollution. *Meteorol Disaster Reduc Res* 2011;34:1–6;

GARCIA, F.A.P., Mirlean, N., Baisch, P.R., 2010. Marcadores metálicos como avaliação do impacto crônico de emissões petroquímicas em zona urbana. *Quim Nova*. 33, 716-720;

GRANTZ, D.A., Garner, J.H.B., Johnson, D.W., 2003. Ecological effects of particulate matter. *Environ. Int.* 29, 213– 239;

HE, Z., Li, F., Dominech, S., Wen, X., & Yang, S. (2019). Heavy metals of surface sediments in the Changjiang (Yangtze River) Estuary: Distribution, speciation and environmental risks. *Journal of Geochemical Exploration*, 198, 18–28. doi:10.1016/j.gexplo.2018.12.015;

HEAL, M.R., Hibbs, L.R., Agius, R.M., Beverland, I.J., 2005. Total and water-soluble trace metal content of urban background PM10, PM2.5 and black smoke in Edinburgh, UK. *Atmos. Environ.* 39, 1417–1430;

HULKA, B.S. 1990. Overview of biological markers. In: *Biological markers in epidemiology*. Hulka B.S., Griffith J.D., Wilcosky, T.C., (eds), 3–15. New York: Oxford University Press;

IARC - International Agency for Research on Cancer, 2016. Agents Classified by the IARC Monographs. V. 1–117. [http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest\\_classif.php](http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php);

JÄRUP L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull.* 2003;68:167-82

JIN, L., Xie, J., Wong, C., Chan, S., Abbaszade, G., Schnelle-Kreis, J., Zimmermann, R., Li, J, Zhang, G., Fu, P., Li, X., 2019. Contributions of city-specific fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) to differential in vitro oxidative stress and toxicity implications between Beijing and Guangzhou of China. *Environ. Sci. Technol.* 53 (5), 2881–2891;

KADIISKA, M. B., Mason, R. P., Dreher, K. L., Costa, D. L., & Ghio, A. J. (1997). In Vivo Evidence of Free Radical Formation in the Rat Lung after Exposure to an Emission Source Air Pollution Particle†. *Chemical Research in Toxicology*, 10(10), 1104–1108. doi:10.1021/tx970049r;

KADO NY, Langley D, Eisenstatd E (1983) A simple modification of the Salmonella liquid incubation assay. *Mutat Res* 121:25–32;

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;

KANNAN, S., Misra, D. P., Dvonch, J. T., & Krishnakumar, A. (2006). Exposures to Airborne Particulate Matter and Adverse Perinatal Outcomes: A Biologically Plausible Mechanistic Framework for Exploring Potential Effect Modification by Nutrition. *Environmental Health Perspectives*. doi:10.1289/ehp.9081;

KESSLER, N., Schauer, J.J., Yagur-Kroll, S., Melamed, S., Tirosh, O., Belkin, S., Erel, Y., 2012. A bacterial bioreporter panel to assay the cytotoxicity of atmospheric particulate matter. *Atmos. Environ.* 63, 94e101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.09.048>;

KIM, K.-H., Kabir, E., & Kabir, S. (2015). A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environment International*, 74, 136–143. doi:10.1016/j.envint.2014.10.005;

KHILLARE, P. S., & Sarkar, S. (2012). Airborne inhalable metals in residential areas of Delhi, India: distribution, source apportionment and health risks. *Atmospheric Pollution Research*, 3(1), 46–54. doi:10.5094/apr.2012.004;

KOUBA, A., Buric, M., Kozák, P., 2010. Bioaccumulation and Effects of Heavy Metals in Crayfish: A Review. *Water Air Soil Pollut.* 211 (1-4), 5-16;

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., Lemos, C.T., Flores, A.N., Pantoja, E.O., Rocha, J.A., Vargas, V.M., 2016. Genotoxicity biomarkers for airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in an area under petrochemical influence. *Chemosphere*. 159, 610-618. doi:10.1016/j.chemosphere;

LEMOS, A. T., de Lemos, C. T., Coronas, M. V., da Rocha, J. R., & Vargas, V. M. F. (2020). Integrated study of genotoxicity biomarkers in schoolchildren and inhalable particles in areas under petrochemical influence. *Environ. Res.*, 109443. doi:10.1016/j.envres.2020.109443;

LIPPMANN, M. Particulate matter (PM) air pollution and health: regulatory and policy implications. *Air Qual Atmos Health* 5, 237–241 (2012). <https://doi.org/10.1007/s11869-011-0136-5>;

MARON, D.M. & Ames, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, v. 11, p. 173-215, 1983;

MORTELMANS, K. & Zeiger, E., 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*. 455:29-60;

NAGAJYOTI, P. C., Lee, K. D., Sreekanth, T. M. V., 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett.* 8:199–216;

OHE, T., Watanabe, T., Wakabayashic, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res.* 567, 109–149;

PALACIO, I.C., Barros, S.B.M., Roubicek, D.A. 2016. Water-soluble and organic extracts of airborne particulate matter induce micronuclei in human lung epithelial A549 cells. *Mutat. Res.* 812, pp. 1-11;

PALACIO, I. C., Oliveira, I. F., Franklin, R. L., Barros, S. B. M., & Roubicek, D. A. (2016). Evaluating the mutagenicity of the water-soluble fraction of air particulate matter: A comparison of two extraction strategies. *Chemosphere*, 158, 124–130. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.05.058b;

PEREIRA et al., 2010; 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;

PFEIFFER P.,Göttlich, B., Reichenberger,S., Feldmann, E., Daza,P., Ward,J.F., Milligan, J.R.,Mullenders,L.H.F., Natarajan, A.T.,1996. DNA lesions and repair. *Mutat. Res.* 366, 69-80;

Pope III, C. A. (2002). Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality, and Long-term Exposure to Fine Particulate Air Pollution. *JAMA*, 287(9), 1132. doi:10.1001/jama.287.9.1132;

QUITÉRIO, S.L., Silva, C.R.S., Arbilla, G., Escaleira, V., 2004. Metals in airborne particulate matter in the industrial district of Santa Cruz, Rio de Janeiro, in an annual period. *Atmos. Environ.* 38, 321-331;

RAMÍREZ, O., Sánchez de la Campa, A. M., Sánchez-Rodas, D., & de la Rosa, J. D. (2020). Hazardous trace elements in thoracic fraction of airborne particulate matter:

Assessment of temporal variations, sources, and health risks in a megacity. *Science of the Total Environment*, 710, 136344. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.136344;

ROUBICEK DA, Gutiérrez-Castillo ME, Sordo M, Cebrián-García ME, Ostrosky-Wegman P. 2007. Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City. *Mutat Res.* 10; 631(1):9-15;

SCHNOOR, J.L., 1996. *Environmental Modeling: Fate and Transport of in Water, Air and Soil*. John Wiley e Sons, New York;

SEBRAE: Perfil das Cidades Gaúchas. In: *Datasebrae*. [S. l.], 2 jul. 2022. Disponível em: [https://datasebrae.com.br/municipios/rs/Perfil\\_Cidades\\_Gauchas-Triunfo.pdf](https://datasebrae.com.br/municipios/rs/Perfil_Cidades_Gauchas-Triunfo.pdf). Acesso em: 2 jul. 2022;

SEINFELD, J. H.; PANDIS, S. N. *Atmospheric Chemistry and Physics: From air pollution to climate change*. USA: Wiley – Interscience Publication, 2006;

SHAH ASV, Langrish JP, Nair H, McAllister DA, Hunter AL, Donaldson K, et al. Global association of air pollution and heart failure: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet* 2013;382:1039–48;

SHUSTER-Meiseles, T., Shafer, M. M., Heo, J., Pardo, M., Antkiewicz, D. S., Schauer, J. J. Rudich, Y. (2016). ROS-generating/ARE-activating capacity of metals in roadway particulate matter deposited in urban environment. *Environmental Research*, 146, 252–262. doi:10.1016/j.envres.2016.01.009;

SILVA, C.S., Rossato, J.M., Rocha, J.A.V., Vargas, V.M.F., 2015. Characterization of an area of reference for inhalable particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) associated with genetic biomonitoring in children. *Mutat Res.* 778, 44–55;

SOUZA, V.H.E., 2006. Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo de efluentes de uma indústria de papel e celulose de Santa Catarina em *Allium cepa*.

Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Florianópolis. 160p;

TSALEV, D.L., Zaprianov, Z.K., 1983. Anatomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice. CRC, Boca Raton FL, USA. Vol 1;

UMBUZEIRO, G. & Vargas, V. M. F, 2003, Teste de mutagenicidade em *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos, pp. 81-112. In: Ribeiro, L. R., Salvadori, D. M. F., Marques, E. K. (orgs.), Mut. Amb.1.ed. ULBRA, Canoas, 356p;

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). Air & Radiation Home. 2011. Disponível em: <<http://www.epa.gov/air/>>. Acesso em junho, 2022;

USEPA, METHOD 3546: microwave extraction. [S. l.], 14 jul. 2021. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/3546.pdf>. Acesso em: 07 jun. 2022;

VAN DER OOST, R., Beyer, J., Vermeulen N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Phar.* 13, 57-149;

VARGAS, V.M.F., 2003. Mutagenic activity as a parameter to assess ambient air quality for protection of the environmental and human health. *Mutat. Res.* 544, 313-319;

VARGAS, V. M. F., Motta, V. E. P., & Henriques, J. A. P. (1993). Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 319(1), 31–45. doi:10.1016/0165-1218(93)90028-c;

VARGAS, V.M.F., Horn, R.C., Guidobono, R.R., Mittelstaedt, A.B., Azevedo, I.G., 1998. Mutagenic activity of airborne particulate matter from the urban area of Porto Alegre. *Genet. Mol. Biol.* 21, 247–253;

VELALI E, Papachristou E, Pantazaki A, Choli-Papadopoulou T, Planou S, Kouras A, Manoli E, Besis A, Voutsas D, Samara C. 2016. Redox activity and in vitro bioactivity of the

watersoluble fraction of urban particulate matter in relation to particle size and chemical composition. *Environ Pollut.* 208 (Pt B): 774-86;

WHITE, P. A., Claxton, L. D., 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mut. Res.* 567, 227–345;

WHO – World Health Organization, 2005. Particulate Matter Air Pollution: How it Harms Health. Fact Sheet Euro/04/05. Berlin, Copenhagen, Rome, pp. 1–4;

WHO - World Health Organization, 2006. Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide; Global update 2005. Geneva.

WHO - World Health Organization, 2016. Ambient air pollution: A global assessment of exposure and burden of disease. Geneva, Suíça. 131pgs. ISBN 9789241511353;

WHO- World Health Organization. 2020. WHO global strategy on health, environment and climate change: the transformation needed to improve lives and well-being sustainably through healthy environments. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. [https://www.who.int/phe/publications/global\\_strategy/en/](https://www.who.int/phe/publications/global_strategy/en/) (aces: 21/07 2020);

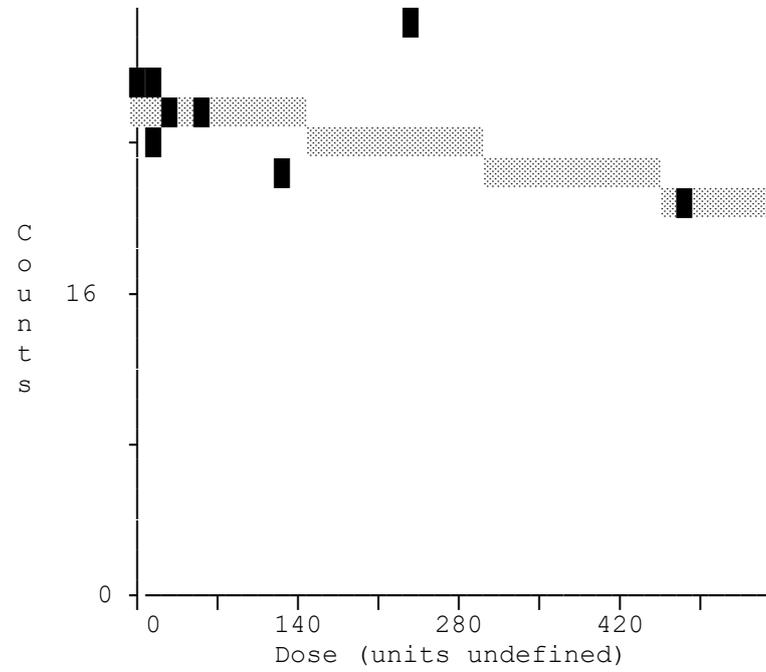
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Review of Evidence on Health Aspects of Air Pollution- REVIHAAP Project: Technical Report, World Health Organization (WHO), 2013;

WISEMAN, C. L. S. (2015). Analytical methods for assessing metal bioaccessibility in airborne particulate matter: A scoping review. *Analytica Chimica Acta*, 877, 9–18. doi:10.1016/j.aca.2015.01.024.



SALANAL: record 1

Experiment Date: 22.02.2022  
Experiment #: Outono NO  
Test Sample Name:  
Tester Strain: TA98



■ = Observed; ▨ = Predicted.

The predicted values are based on Linear model.

## 8. ANEXO B – MODELO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA (SALANAL)

SALANAL: record 1

Test Sample Name: outono 1  
 Source/Batch/Lot:  
     Solvent: H2O  
     Exp. Date: 19-11-21  
     Exp. No.: NO  
 Technician:  
 Assay Type: Preincubation - Time [90] Temp [37]  
 Strain: TA102

Metabolic activation: None

Data File Name:

Code	Dose	--	counts	--	Mean	S.D.	Predicted Bernstein
	0.00	428	268		348.00	113.14	420.26
	7.50	502	449	436	462.33	34.96	432.41
	15.00	514	487	448	483.00	33.18	444.57
	30.00	497	514	542	517.67	22.72	468.87
	60.00	502	421	523	482.00	53.86	517.48
	120.00	525	455	485	488.33	35.12	
	240.00	472	452	468	464.00	10.58	
	480.00	420	376	412	402.67	23.44	
n	-1.00	760n	444n	324n			
p	-1.00	3856p	3192p				

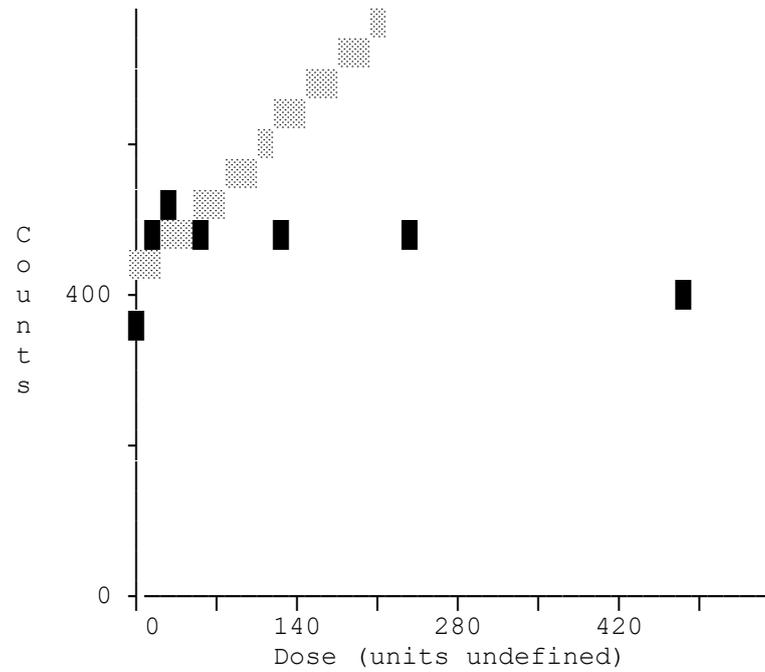
P-value for ANOVA test of dose response is 0.013  
 An acceptable model is Bernstein with pval = 0.083  
 Bernstein model used the first 5 doses

Estimate of the slope is = 1.620336 .  
 Standard error of the slope is = 0.593759 .  
 90% confidence limits for the slope are <0.579324, 2.661349>.

P-value for the test of the positive dose response  
     (slope at origin) is 0.008  
 Note: Smaller P-value means more positive dose response

SALANAL: record 1

Experiment Date: 19-11-21  
Experiment #: NO  
Test Sample Name: outono 1  
Tester Strain: TA102



■ = Observed; ▨ = Predicted.  
The predicted values are based on Bernstein model.