

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

Tese de Doutorado

**GENOTOXICIDADE DE MATERIAL PARTICULADO INALÁVEL
ASSOCIADO AO BIOMONITORAMENTO DE ESCOLARES EM ÁREA DE
INFLUÊNCIA PETROQUÍMICA**

ANDRÉIA TORRES DE LEMOS

PORTO ALEGRE

Janeiro de 2017

**GENOTOXICIDADE DE MATERIAL PARTICULADO INALÁVEL ASSOCIADO AO
BIOMONITORAMENTO DE ESCOLARES EM ÁREA DE INFLUÊNCIA PETROQUÍMICA**

Andréia Torres de Lemos

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

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

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Catarina da Silva Pedrozo

Prof^a. Dr^a. Juliana da Silva

Prof^a. Dr^a. Kelly Cristina Tagliari de Brito

Porto Alegre, Janeiro de 2017

*Dedico este singelo trabalho à minha mãe,
Clarice, que não se contentou em ser só mãe, e foi
também professora, laboratorista, consultora,
estagiária, auxiliar de campo, motorista, técnica,
tradutora, datilógrafa, referee, amiga, confidente,
terapeuta, cozinheira, enfermeira...*





“A rapidez da mudança e a velocidade com que novas situações são criadas seguem o ritmo impetuoso e insensato da humanidade, e não o passo cauteloso da natureza.”

(...)

“Grande parte do conhecimento necessário está agora disponível, mas nós não o usamos. Treinamos ecologistas em nossas universidades e até mesmo os empregamos em nossos órgãos governamentais, mas raramente seguimos seus conselhos.”

Rachel Carson, 1962 em Primavera Silenciosa

AGRADECIMENTOS

Esta conquista não seria alcançada sem o auxílio de muitas mãos amigas, que por diversas vezes ofereceram sua atenção, consolos, conselhos e minimizaram os percalços do caminho. A vocês, meus agradecimentos:

À minha orientadora, Dra. Vera Maria Ferrão Vargas, agradeço pelas oportunidades ao longo dos últimos 11 anos e pela confiança que sempre demonstrastes para comigo. Foi uma longa jornada de aprendizado e de crescimento pessoal e acadêmico, pelos quais sempre serei grata.

À Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM), pela oportunidade de desenvolvimento desta pesquisa, em especial ao Programa de Pesquisas Ambientais por subsidiar o desenvolvimento científico na avaliação da qualidade ambiental;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, seus professores e funcionários, em especial à professora Catarina Pedrozo pelo acolhimento na disciplina de docência, tão temida por mim; e à Silvana Barzotto, sempre prestativa.

A CAPES pela bolsa de doutorado concedida;

À Equipe de Amostragem da FEPAM pela realização das coletas de material particulado atmosférico, em especial ao Roberto Claro pelo auxílio nas tratativas para instalação do amostrador de PM10.

À Eng. Ieda Maria C. Silva pelo auxílio na escolha dos locais de amostragem, na interpretação dos estudos de modelagem atmosférica e por sua atenção e disponibilidade para ajudar sempre que necessário;

Aos funcionários e estagiários da Divisão de Biologia da FEPAM, que compartilharam seus conhecimentos ao longo dos anos;

A todos os integrantes do antigo Laboratório de Mutagênese Ambiental da FEPAM, em especial à Bibiana K. Dutra e Paula R. Gameiro pela amizade; À Eduarda O. Pantoja e a Jéssica R. da Rocha, pela parceria nas atividades do laboratório, amizade, companheirismo e apoio. À Naiara Pereira, Kauê H. Assis e Marcelo R. Pacheco pelo auxílio valioso no dia-a-dia de trabalho. À Jocelita A.V. Rocha pelas incontáveis extrações e conselhos apaziguadores.

À Dra. Clarice T. de Lemos, pelos ensinamentos essenciais da citogenética e disponibilização de seu laboratório. Aos integrantes do extinto Laboratório de Citogenética da FEPAM, pelo auxílio na realização dos ensaios citogenéticos, em especial, à Andressa N. Flores, Caroline C. Barros, Paula R. Neves, Christian Schäfer, Gabriele T. Kowalski.

À Direção e funcionários das Escolas participantes do estudo, por reconhecerem a importância do trabalho e por sempre terem me recebido muito bem. Especial agradecimento à Diloá, Rosa e Sônia, que intermediaram a comunicação com os pais e responsáveis e motivaram os mesmos a participar do estudo.

Agradeço todos os corajosos voluntários do estudo, seus pais e responsáveis, pela valiosa doação, sem a qual este estudo não seria possível.

À Márcia Käeffer, que foi providencial, se dispondo a ajudar em momento de dificuldade nas coletas de biomonitoramento, e mostrando um talento inesperado com as crianças!

À Mariana Coronas, pela amizade, sugestões e esclarecimentos ao longo desses anos;

Ao Gilberto P. Mesquita, pela assessoria estatística e o esclarecimento de incontáveis dúvidas;

À minha banca de qualificação, Professoras Dra. Catarina da Silva Pedrozo, Dra. Juliana da Silva e Dra. Kelly Cristina Tagliari de Brito, pelas valiosas contribuições que auxiliaram na publicação do primeiro artigo desta tese;

À Dra. Juliana da Silva, por generosamente disponibilizar seu equipamento de análise de imagem para avaliação do Ensaio Cometa;

Ao amigo Gustavo, pelo apoio constante e por me incentivar ao longo desse doutorado, começando pela torcida durante o processo de seleção.

À minha família, pelo amor, apoio, força e incentivo, essenciais no curso de meus caminhos. Ao meu pai, Ademar Getúlio, ecologista amador que me ensinou o apreço a todos os seres vivos (me mostrou a beleza dos pássaros, árvores e minhocas) e a valorização do estudo e do trabalho; À minha mãe, Clarice, que me fez levantar da cama e seguir em frente e me carregou no colo quando eu não queria andar. À minha irmã, Adriana, por ser meu exemplo de força e determinação e minha melhor amiga. Obrigada por me trazer para nossa Ohana.

RESUMO

A boa qualidade do ar é fator essencial para manutenção da saúde humana e ambiental. O material particulado atmosférico é um poluente do ar que consiste de uma variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas, entre as quais, algumas apresentam características genotóxicas. O ramo petroquímico é um importante componente da atividade industrial do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, com histórico de emissões prejudiciais à qualidade do ar. O presente estudo objetivou avaliar os efeitos biológicos associados à dispersão de material particulado atmosférico inalável em área sob influência de um complexo petroquímico, integrando os resultados de biomonitoramento ambiental e humano através de biomarcadores de genotoxicidade. Amostras de material particulado foram coletadas em área de característica mista rural, urbana e industrial, utilizando filtros de membrana de Teflon e amostradores de grandes volumes de ar, semanalmente, por períodos de 24hs. Partículas inaláveis finas (MP2,5) foram amostradas em dois locais- NO e NE - posicionados na primeira e segunda direção preferencial dos ventos na região de estudo, a 2,5Km de distância da principal fonte emissora da central de matérias-primas do complexo petroquímico. Em um terceiro local (NO II), afastado 35Km da fonte emissora e na primeira direção dos ventos foi analisado partículas inaláveis grossas (MP10). Extratos orgânicos foram obtidos dos filtros com solvente diclorometano e avaliados pelo ensaio *Salmonella*/microsoma, método de microsuspenção, com as linhagens TA98, YG1021 e YG1024. Para avaliar a mutagenicidade dos metabólitos utilizou-se a fração de metabolização de mamíferos (S9). Também foram empregados Ensaio Cometa (EC) e Teste de Micronúcleos em linhagem celular de pulmão de hamster chinês (V79), nos extratos dos locais NO e NE. Os 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) considerados preferenciais pela agência ambiental norte americana (USEPA) foram avaliados nos extratos orgânicos para caracterização dos três locais. Foi realizado o biomonitoramento humano em crianças de escolas públicas do Local NO e NO II, com coleta de sangue periférico e células esfoliadas da mucosa oral. Em sangue periférico foi utilizado o Ensaio do micronúcleo (MN) com bloqueio da citocinese- citoma (CBMN-cyt) para avaliar as frequências de células com MN e anomalias nucleares (brotos nucleares - NBUDs, pontes nucleoplásmicas -NPBs), e EC avaliando o parâmetro intensidade de cauda. Utilizou-se o Ensaio do MN em mucosa oral-citoma (BMCyt) para detectar MN e anomalias nucleares. Todos os extratos de MP2,5 mostraram mutagenicidade pelo ensaio *Salmonella*, sendo destacada a presença de compostos nitrogenados. Verificaram-se respostas genotóxicas no EC em 87% dos extratos testados e indução de micronúcleos em 74% dos ensaios

realizados, além de citotoxicidade em V79, para todas as amostras avaliadas. Os resultados obtidos nos três biomarcadores *in vitro*, e o perfil de HPAs mais tóxicos no material particulado, apontaram pior qualidade do ar do Local NO, sendo compatível com a maior dispersão de poluentes na primeira direção dos ventos. O biomonitoramento contou com a participação de 54 crianças de 5 a 12 anos, com média de $8,3 \pm 1,8$ anos. Danos ao DNA pelo EC foram significativamente mais elevados no local NO, em relação ao local NO II. A frequência de MN no CBMN-cyt não diferiu entre os grupos, porém, foram significativamente maiores em relação a um local de referência externo. A ocorrência de NBUDs foi significativamente mais elevada no local NO II. Quanto ao ensaio BMCyt, não houve diferença entre os grupos para MNs e NBUDs. As frequências das alterações nucleares, cariorréxis e cariólise, foram significativamente mais elevadas no local mais afastado da fonte emissora (NOII). A avaliação ambiental associando o Ensaio *Salmonella* e análise de HPAs mostrou que mesmo amostras dentro dos padrões de controle da qualidade, apresentam potencial genotóxico. Estes resultados permitiram evidenciar que as crianças avaliadas estão expostas a uma mistura de contaminantes de diferentes fontes, sendo a proximidade da indústria petroquímica um contribuinte aos fatores de risco. Medidas são necessárias para identificar e reduzir emissões e efeitos perigosos, uma vez que os padrões de qualidade do ar não são suficientes para garantir a saúde das populações expostas. A complexa composição do MP2,5 pode provocar diversos efeitos genotóxicos, sendo a utilização de diferentes bioensaios fundamental para o entendimento dos efeitos dessa matriz.

Palavras-chave: Ensaio *Salmonella*/microsoma, Ensaio Cometa, Teste de Micronúcleos, MP2,5, Biomonitoramento, Complexo petroquímico.

ABSTRACT

Good air quality is essential key to human and environmental health maintenance. Atmospheric particulate matter is an air pollutant consisting of a variety of organic and inorganic substances, some of which presents genotoxic characteristics. The petrochemical industry is an important activity in Rio Grande do Sul state, Brazil, with a history of emissions that are detrimental to air quality. The present study aimed to evaluate the biological effects associated with the dispersion of inhalable particulate matter in an area under the influence of a petrochemical complex, integrating the results of environmental and human biomonitoring through genotoxicity biomarkers. Particulate matter samples were collected in mixed rural, urban and industrial area, using Teflon membrane filters and large air volume samplers, weekly, for periods of 24 hours. Fine inhalable particles (PM_{2.5}) were sampled at two locations - NO and NE - positioned in the first and second preferential wind directions in the study region, 2.5 km away from the main emission source of industrial raw material center. In a third location (NO II), 35 km away from the emission source and in the first wind direction, coarse inhalable particles (MP₁₀) were analyzed. Organic extracts were obtained with dichloromethane from sampled filters and evaluated by the *Salmonella*/microsome assay, microsuspension method, with the strains TA98, YG1021 and YG1024. The mammalian metabolism fraction (S9) was used to evaluate metabolite mutagenicity. Also, the Comet Assay (EC) and Micronucleus Test in Chinese hamster lung cell line (V79) was used to test the NO and NE samples. The 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) considered preferential by the US Environmental Agency (USEPA) were evaluated in the organic extracts for characterization of the three sites. Human biomonitoring was carried out in children of public schools from NO and NO II sites, through the collection of peripheral blood and buccal exfoliated cells. To peripheral blood samples, the cytokinesis-block MN cytome assay (CBMN-cyt) was used to evaluate the frequencies of cells with micronuclei (MN) and nuclear abnormalities (nuclear buds - NBUDs, nucleoplasmic bridges - NPBs), and EC evaluating the tail intensity. The buccal MN cytome assay (BMCyt) was used to detect MN and nuclear abnormalities. All PM_{2.5} extracts showed mutagenicity through the *Salmonella* assay, highlighting the nitrogenated compounds effects. Genotoxic responses in EC were observed in 87% of the tested extracts and MN induction in 74% of the tests, in addition all the samples showed cytotoxicity to V79 cells. The results of the three biomarkers *in vitro* and the more toxic PAHs profile presented by the particulate matter, showed a lower air quality of NO site. It is compatible with the greater pollutants

dispersion in the first winds direction. Biomonitoring included 54 school children aged 5 to 12 years, with a mean of 8.3 ± 1.82 years. DNA damage evaluated by EC was significantly higher in children from NO compared to NO II. The MN frequency by CBMN-cyt did not differ between groups, however, it was significantly higher in relation to an external reference site. The occurrence of nuclear buds was higher at the NO II site. Regarding the BMCyt assay, there was no difference between groups for MNs and NBUDs. The frequencies of nuclear abnormalities, karyorrhexis and karyolysis were significantly higher at the site farthest from the emission source (NOII). The environmental evaluation with the *Salmonella* assay and PAH analysis showed genotoxic potential even to samples within the quality standards. These results showed that the schoolchildren are exposed to a mixture of contaminants from different sources, being the proximity of the petrochemical industry a risk factor. Actions are needed to identify and reduce emissions and adverse effects since air quality standards are not enough to ensure the health of exposed populations. The complex PM_{2.5} composition could cause several genotoxic effects, and the use of different bioassays is fundamental for understanding the effects of this environmental matrix.

Keywords: *Salmonella*/microsome assay, Comet assay, Micronucleus assay, PM_{2.5}, biomonitoring, petrochemical complex.

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Lista de figuras.....	3
Lista de tabelas.....	4
Lista de abreviações.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. Material particulado atmosférico.....	12
1.2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	19
1.3. Biomarcadores.....	24
1.4. Biomonitoramento humano.....	26
1.5. Biomonitoramento em crianças.....	27
1.6. Ensaio de genotoxicidade utilizados neste estudo.....	29
1.6.1. Ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma.....	29
1.6.2. Ensaio cometa.....	31
1.6.3. Teste do MN.....	33
1.7. Área de estudo.....	36
2. OBJETIVOS.....	38
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	39
3.1. CAPÍTULO 1 -GENOTOXICITY BIOMARKERS FOR AIRBORNE PARTICULATE MATTER (PM2.5) IN AN AREA UNDER PETROCHEMICAL INFLUENCE.....	40
Abstract.....	41
1. Introduction.....	41
2. Material and methods.....	42
2.1. Area of study.....	42
2.2. Collection of airborne particulate matter.....	42
2.3. Organic extraction.....	42
2.4. <i>Salmonella</i> /microsome assay.....	43
2.5. Micronucleus test in V79.....	43
2.6. Comet assay in V79 cell line.....	44
3. Results.....	44
4. Discussion.....	45
5. Conclusion.....	48

6. References.....	48
Supplementary contente.....	50
3.2. CAPÍTULO 2 - ESTUDO INTEGRADO DE BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE EM ESCOLARES E PARTÍCULAS INALÁVEIS DE ÁREAS COM INFLUÊNCIA PETROQUÍMICA.....	51
Resumo.....	53
1. Introdução.....	54
2. Material e métodos.....	56
2.1. Área de estudo.....	56
2.2. Avaliação ambiental.....	58
2.2.1. Coleta do material particulado atmosférico e extração orgânica.....	58
2.2.2. Análise de Hidrocarbonetos Policíclicos	58
2.2.3. Ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma.....	59
2.3. Avaliação de biomarcadores genéticos humano.....	60
2.3.1. Amostragem e coleta de material biológico.....	60
2.3.2. Ensaio do Cometa.....	61
2.3.3. Teste do Micronúcleo em células da mucosa oral e sangue periférico.....	61
3. Resultados e discussão.....	62
3.1. Avaliação ambiental.....	62
3.2. Biomarcadores genéticos em crianças	70
4. Conclusões.....	79
5. Referências bibliográficas.....	81
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
6. ANEXOS.....	112

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO

Figura 1 - Determinantes da saúde humana e bem-estar.....	10
Figura 2 – Algumas estruturas e componentes do Material Particulado Atmosférico.....	13
Figura 3 - Classificação do material particulado atmosférico de acordo com seu diâmetro aerodinâmico.....	15
Figura 4 – Profundidade de penetração de partículas atmosféricas no trato respiratório humano.....	17
Figura 5 – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos considerados prioritários pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos.....	21
Figura 6 – Sequência de respostas à poluentes estressores em sistemas biológicos.....	26
Figura 7 – Tipos celulares avaliados pelo Ensaio do MN em Mucosa Oral – Citoma, BMCyt.....	35
Figura 8 – Área de estudo localizada no município de Triunfo/RS.....	38

3.1. CAPÍTULO 1 - GENOTOXICITY BIOMARKERS FOR AIRBORNE PARTICULATE MATTER (PM2.5) IN AN AREA UNDER PETROCHEMICAL INFLUENCE

Figure 1 – Area of study in the city of Triunfo/RS/Brazil	43
Figure 2 – Mutagenicity in revertants/m ³ of organic extracts of PM2.5 from areas under the influence of the petrochemical industry positioned in the first (Site NO) and second (Site NE) preferential direction of the winds.....	45

3.2. CAPÍTULO 2 - ESTUDO INTEGRADO DE BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE EM PARTÍCULAS INALÁVEIS E ESCOLARES DE ÁREAS COM INFLUÊNCIA PETROQUÍMICA

Figura 1 – Área de estudo e locais de amostragem na cidade de Triunfo/RS/Brasil.....	57
Figura 2 – Somatórios de a) HPAs e b) atividade mutagênica em extratos orgânicos de material particulado atmosférico.....	66
Figura S1 – Correlações entre os biomarcadores em sangue periférico A) intensidade de cauda e B) frequência de micronúcleos, com a idade de escolares expostos à poluição atmosférica.....	77

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO

Tabela 1 – Limites de material particulado atmosférico, em $\mu\text{g}/\text{m}^3$, estabelecidos pela Legislação Brasileira (CONAMA) e Organização Mundial de Saúde (OMS)..... 18

Tabela 2 – Fatores de Equivalência Tóxica (TEFs) para Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) selecionados de acordo com diferentes autores..... 23

3.1. CAPÍTULO 1 - GENOTOXICITY BIOMARKERS FOR AIRBORNE PARTICULATE MATTER (PM2.5) IN AN AREA UNDER PETROCHEMICAL INFLUENCE

Table 1 – Data on the filters containing PM2.5 collected in an area under the influence of the petrochemical industry..... 44

Table 2 – Mutagenicity and cell survival of organic extracts of fine inhalable particles in areas under the influence of a petrochemical industry..... 45

Table 3 – Genotoxic analysis in the V79 cell line of organic extracts of PM2.5 of areas under the influence of the petrochemical industry..... 47

Table A.1 – Mutagenicity in revertants/ m^3 of organic extracts of fine inhalable particles in areas under the influence of a petrochemical industry..... 51

3.2. CAPÍTULO 2 - ESTUDO INTEGRADO DE BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE EM PARTÍCULAS INALÁVEIS E ESCOLARES DE ÁREAS COM INFLUÊNCIA PETROQUÍMICA

Tabela 1 – Dados dos filtros contendo material particulado, coletados a diferentes distâncias de emissões petroquímicas por períodos de 24hs 63

Tabela 2 – Concentrações (ng/m^3) de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em partículas atmosféricas..... 65

Tabela 3 - Mutagenicidade em revertentes/ μg e sobrevivência celular em *Salmonella* de extratos orgânicos de material particulado atmosférico..... 69

Tabela 4. Biomarcadores de genotoxicidade em amostras de sangue periférico total de escolares expostos à poluição atmosférica..... 73

Tabela 5. Biomarcadores de genotoxicidade em amostras de mucosa oral de escolares expostos à poluição atmosférica..... 74

Tabela S1 – Correlações entre alterações nucleares e danos ao DNA em células de mucosa oral..... 78

LISTA DE ABREVIACOES

Português/ Inglês

2AF - 2 – aminofluoreno/ 2- aminofluorene

2NF – 2 – nitrofluoreno/ 2- nitrofluorene

4NQO – 4 nitroquinoleína 1-óxido/ 4-nitroquinoleine oxide

ABNT – Associao Brasileira de Normas Técnicas

AGV – Amostrador de Grandes Volumes

ANCOVA - Análise de Covariância

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry

B(a)P – Benzo(a)Pireno

BI – Células Binucleadas

BMCyt – Ensaio do Micronúcleo em Mucosa Oral – Citoma / Buccal Micronucleous Cytome Assay

CBMN-Cyt - Ensaio de Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese- Citoma / Cytokinesis Block Micronucleus CytomeAssay

CC – Células com Cromatina Condensada

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CIT-B/ Cyt-B - Citocalasina-B/ Cytochalasin- B

CO – Monóxido de carbono

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CRL – Carilise ou Célula Cariolítica

CRX – Cariorrxis ou Célula Cariorréxica

DCM – Diclorometano/ Dichloromethane

DMSO – Dimetilsulfóxido/ Dimethyl sulfoxide

EC / SCGE - Ensaio Cometa / Eletroforese em gel de célula única - Single cell gel electrophoresis assay

EEA – Agência Ambiental Européia / European Environment Agency

FEPAM – Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler

H₂O₂ – Água oxigenada

HPA/ PAH- Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos/ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer /International Agency for Research on Cancer

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC - Intensidade de cauda

IHME - Instituto de Avaliações e Métricas em Saúde / Institute for Health Metrics and Evaluation

IMC - Índice de Massa Corporal

MLG – Modelos Lineares Generalizados

MN – Micronúcleo

MOE/EOM – Matéria Orgânica Extraída/ Extracted Organic Matter

MONO - Células Mononucleadas

MP/ PM - Material particulado atmosférico/ Airborne particulate matter

MTBE - Éter Metil Terciário Butílico / Methyl Tert - Butyl Ether

NAAQS - National Ambient Air Quality Standards

NBUDs – Brotos Nucleares/ Nuclear buds

Nitro-HPA/ Nitro-PAH – Nitroderivado de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

NO_x - Óxidos de nitrogênio

NPBs – Pontes Nucleoplásmicas/ Nucleoplasmic bridges

O₃ - Ozônio

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development

OMS/ WHO – Organização Mundial de Saúde/ World Health Organization

PCB – Bifenila Policlorada / Polychlorinated Biphenyl

PIC – Picnose ou Células Picnóticas

MP10/ PM10 – Partículas inaláveis (<10µm diâmetro aerodinâmico)/ Inhalable particles

MP2,5/ PM2.5 – Partículas inaláveis finas (<2.5µm diâmetro aerodinâmico)/ Fine inhalable particles

POPs – Poluentes Orgânicos Persistentes

PTS/ TSP – Partículas Totais em Suspensão/ Total Suspended Particles (<50µm diâmetro aerodinâmico)

RPF - Fator de Potência Relativo / Relative potency fator

S9 – Fração de metabolização hepática de mamífero *in vitro*

SAS - Statistical Analysis System (*software*)

SO₂ - Dióxido de enxofre

TEF - Fator de Equivalência Tóxica / Toxic equivalency fator

TEQ - Quociente de toxicidade equivalente

UF - Partículas Ultrafinas

USEPA – Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana / US Environmental Protection Agency

V79 - Culturas de células de pulmão de hamster chinês

1. INTRODUÇÃO

A ação antrópica tem aumentado rapidamente a emissão anual de poluentes, tornando a poluição ambiental um problema global e sem fronteiras, que afeta o ar, a água, o solo e os ecossistemas, prejudicando a saúde e bem-estar humanos. As principais atividades poluidoras estão ligadas a queima de combustíveis fósseis, a aplicação de fertilizantes sintéticos e pesticidas e ao uso crescente de produtos químicos (EEA, 2015).

Os efeitos da poluição sobre a estrutura das biocenoses têm repercussões apreciáveis em variados graus sobre as características funcionais fundamentais do ecossistema, como produtividade primária, transferência de energia, decomposição da matéria orgânica, reações de controle e auto-regulação interna (Lemos e Terra, 2003). As alterações biológicas resultantes da exposição a poluentes diferem muito entre as espécies, refletindo diferenças no padrão de exposição, nas vias de absorção, no metabolismo após a absorção, nas taxas de acumulação e na sensibilidade dos órgãos-alvo. A longo prazo, o potencial de ocorrer uma perturbação importante na função dos ecossistemas podendo comprometer o desenvolvimento sustentável é considerável, uma vez que várias espécies são susceptíveis a variados poluentes (Rhind, 2009).

A poluição do compartimento atmosférico vem despertando crescente interesse, uma vez que um número cada vez maior de trabalhos reporta a sua associação com efeitos adversos para o ambiente e a saúde humana (Vargas, 2003; Grantz et al., 2003). Respirar um ar limpo e seguro é essencial para a manutenção da saúde, sendo que um humano adulto necessita entre 10.000 a 20.000 litros de ar, diariamente (Morakinyo et al., 2016). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) constataram que em 2014, apenas uma em cada dez pessoas no mundo respiraram ar limpo, e que a poluição do ar é responsável pela morte de três milhões de pessoas anualmente (WHO, 2016a). Só no Brasil, no ano de 2012, foram 26.241 óbitos atribuídos à poluição atmosférica. De acordo com o Instituto de avaliações e métricas em saúde (IHME, 2016), a poluição atmosférica é o quarto fator de risco para mortes prematuras, logo após o tabagismo.

Conforme o exposto acima, a qualidade ambiental é fundamental para a boa saúde humana. Novos modelos ecológicos de saúde têm sido propostos, destacando o papel do ambiente e

considerando-o fundamental para os serviços ecossistêmicos que suportam a vida, saúde e bem-estar humanos (Coutts e Hahn, 2015). Como mostrado na Figura 1, o ambiente “natural” abrange e permeia todas as outras esferas de influência na saúde, indicando que medidas que assegurem a qualidade ambiental tem repercussão positiva na qualidade de vida e saúde da população. Recentemente, a OMS divulgou que 23% das mortes globais e 26% das mortes entre crianças menores de cinco anos ocorrem devido a fatores modificáveis do ambiente, fornecendo uma estimativa de quantas enfermidades podem ser prevenidas pela redução dos riscos ambientais para a saúde (WHO, 2016b). O ambiente é uma plataforma sólida para uma boa saúde pública, comunitária e individual, e ações combinadas de todos os setores envolvidos na relação saúde-ambiente podem fortalecer e sustentar melhorias ao bem-estar humano e à qualidade de vida por meio de múltiplos benefícios sociais e econômicos.

O reconhecimento de que a saúde humana, animal e ambiental são dependentes e conectadas, é a premissa básica do conceito “One health” (Degeling et al., 2015). O termo, relativamente novo (~2003), é definido como o esforço colaborativo de múltiplas disciplinas, em nível local, nacional e internacional, para alcançar a saúde ideal para pessoas, animais e ambiente (Aguirre et al., 2016; AVMA, 2008). Embora a iniciativa busque melhorar a comunicação e colaboração interdisciplinar, pouca atenção vem sendo dada, até o momento, à variável ambiental, sendo necessário maior enfoque nos ecossistemas e contaminantes ambientais (Aguirre et al., 2016).

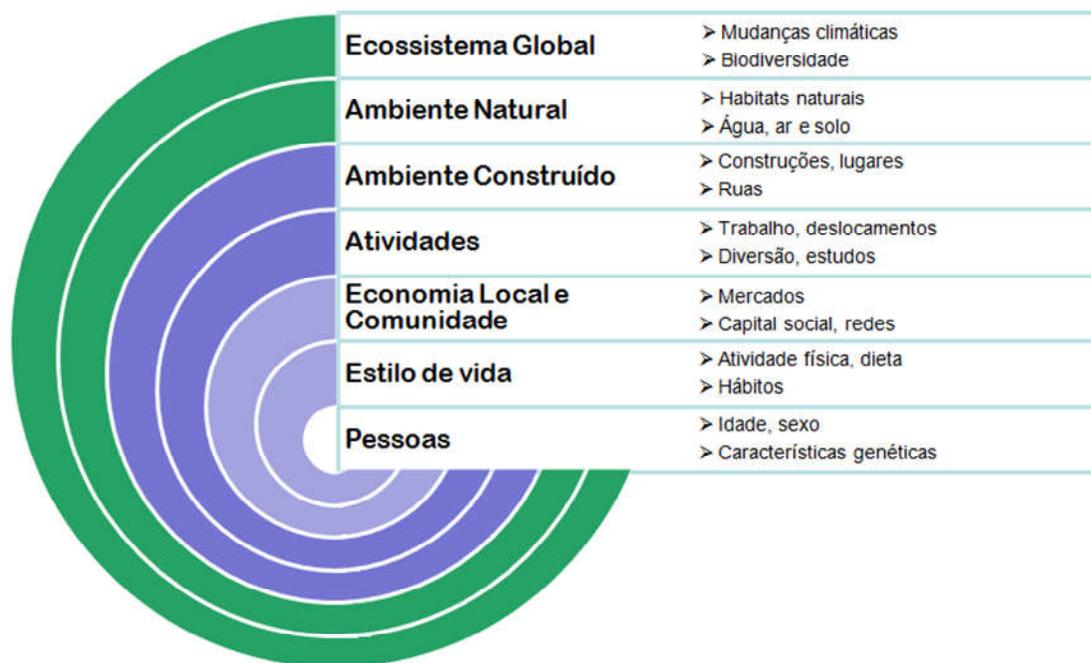


Figura 1 – Determinantes da saúde humana e bem-estar. Adaptado de Coutts e Hahn (2015).

O monitoramento da qualidade do ar é o primeiro passo fundamental a ser tomado pelas autoridades públicas, nas diferentes esferas de governo, para enfrentar o desafio multidisciplinar da poluição atmosférica (WHO, 2016). O principal papel da análise e monitoramento do ar é obter informações analíticas confiáveis que permitam: identificar fontes de emissão de poluentes e a amplitude de sua influência; avaliar a qualidade ambiental e a investigação do destino dos poluentes; avaliar a ecotoxicidade dos poluentes e, averiguar o impacto de novas regulamentações e políticas (Maré et al., 2015).

A determinação da qualidade do ar, geralmente é realizada através do monitoramento de um grupo restrito de poluentes escolhidos devido a sua maior ocorrência, seus efeitos adversos e os recursos disponíveis para sua medição. Os poluentes adotados universalmente como indicadores da qualidade do ar são: dióxido de enxofre (SO₂), monóxido de carbono (CO), ozônio (O₃), óxidos de nitrogênio (NO_x) e material particulado (MP) (CETESB, 2011; WHO, 2006).

Os poluentes do ar podem ser divididos em primários, que são aqueles lançados diretamente pelas fontes de emissão, e secundários, que são os formados posteriormente, através de reações químicas entre poluentes primários e componentes naturais da atmosfera.

Quanto às fontes de emissão, estas podem ser classificadas como fixas ou estacionárias, produzindo cargas pontuais de poluentes, ou móveis, produzindo cargas poluidoras difusas (CETESB, 2011; Vieira, 2009).

A concentração de poluentes no ar é função das emissões, transporte, dispersão e deposição dos poluentes, bem como da forma como estes reagem entre si, além das condições meteorológicas atuantes. Alguns dos parâmetros meteorológicos importantes são: a temperatura, que influencia as reações fotoquímicas geradoras de poluentes secundários na atmosfera; a precipitação, que atua removendo poluentes do ar; a umidade, que influencia as taxas de sedimentação das partículas atmosféricas; a direção e velocidade dos ventos, que se relacionam com os mecanismos de dispersão (Vieira, 2009; Wojas e Almquist, 2007). Condições meteorológicas desfavoráveis à dispersão de poluentes já foram relacionados a episódios graves de poluição (Lippmann, 2009). A topografia local é outro fator que influencia nesta dispersão. Em locais próximos à costa ocorre maior dispersão, enquanto que em áreas cercadas por montanhas, morros, ou dentro de centros urbanos há maior concentração dos mesmos. Outro fator importante é a proximidade de fontes específicas de emissão, uma vez que os níveis de poluentes atmosféricos podem ser mais elevados em localidades como rodovias e indústrias, tornando necessárias medidas especiais de proteção para as populações que vivem no entorno dessas emissões (WHO, 2005).

Entre os contaminantes atmosféricos, alguns são genotóxicos, ou seja, capazes de lesar a estrutura ou função da molécula de DNA, sendo que vários estudos relacionam danos no DNA com subseqüentes alterações a nível molecular, celular e tecidual nos organismos (Ohe et al., 2004).

As lesões no material genético são, geralmente, corrigidas pelo próprio mecanismo de reparo das células, entretanto, alterações não reparadas ou erroneamente reparadas originam mutações pontuais e/ou cromossômicas (Pfeiffer et al., 1996). Geralmente, essas substâncias encontram-se no ambiente em concentrações abaixo do necessário para causar efeitos agudos. No entanto, mesmo em pequenas concentrações, quando um organismo é exposto a essas condições, pode tornar-se incapaz de manter a sua função ecológica (Scott e Sloman, 2004). Substâncias químicas que induzem mutações podem afetar tanto células somáticas, quanto germinativas, tornando-se potenciais causadores de câncer e problemas de fertilidade, respectivamente (Mortelmans e Zeiger, 2000). Mutações não-específicas podem acumular-se

no genoma e persistir na população, resultando, eventualmente, em redução da adaptabilidade e do tamanho populacional (Belfiore e Anderson, 2001). Assim, a investigação dessas substâncias genotóxicas torna-se necessária para garantir a integridade das populações expostas e sua função biológica no ecossistema.

1.1. Material particulado atmosférico

O material particulado (MP) consiste em uma mistura de ampla variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas, em estado sólido ou líquido, que se encontra em suspensão na atmosfera (WHO, 2005). Tais partículas diferem quanto a seu tamanho (de 0,001 μm a 100 μm), origem, mecanismo de formação, composição química e comportamento na atmosfera. A principal forma de classificação destas partículas refere-se a seu diâmetro aerodinâmico (tamanho da partícula), que determina os padrões de transporte, residência no ar e efeitos associados à saúde humana (Englert, 2004; WHO, 2006).

O tamanho das partículas atmosféricas é expresso em termos de diâmetro, como se estas fossem idealmente esféricas, entretanto, geralmente o MP possui formas irregulares. Para homogeneizar a determinação do tamanho dessas partículas, adota-se a medida de diâmetro aerodinâmico equivalente, que se baseia nas propriedades físicas da partícula, ao invés de em suas propriedades geométricas. Dessa forma, o diâmetro aerodinâmico de uma partícula é determinado pelo diâmetro de uma esfera de densidade unitária que possua velocidade de sedimentação no ar equivalente ao particulado em questão (Finlayson-Pitts e Pitts, 2000).

A composição química do MP é bastante variada e inclui partículas minerais (óxidos de alumínio, cálcio, sílica, entre outros), matéria orgânica, carbono elementar, aerossóis inorgânicos secundários (sulfatos, nitratos e amônia), sais marinhos (NaCl) e traços de elementos metálicos (Figura 2). As frações carbonáceas podem ser agrupadas em carbono elementar e orgânico (Morakinyo et al., 2016; WHO, 2013). O carbono elementar, também conhecido como *Black carbon*, é definido como a porção do carbono que absorve fortemente a luz, formado na combustão incompleta de materiais contendo carbono (Viidanoja et al., 2002). Já o carbono orgânico incorpora uma mistura de centenas de compostos orgânicos liberados diretamente na atmosfera ou produzidos a partir de reações secundárias de gás-partículas (Morakinyo et al., 2016). Também estão presentes no MP, partículas de origem biológica, conhecidas como bioaerossóis, compostas de microrganismos viáveis (fungos,

bactérias e vírus), biomoléculas não-viáveis (endotoxinas, células mortas, toxinas e fragmentos microbianos) e pólen (Griffiths e DeCosemo, 1994).

O material particulado é emitido em eventos de origens naturais e antropogênicas. As fontes naturais consistem de emissões de cinzas vulcânicas, incêndios florestais, ressuspensão de poeiras, sais marinhos e materiais biológicos (ex. pólen e bactérias); enquanto as antropogênicas caracterizam-se por atividades industriais, queima de combustíveis fósseis e de biomassa, geração de energia térmica e tráfego de veículos (Vieira, 2009).

A concentração de massa de partículas atmosféricas por diâmetro apresenta distribuição bimodal, com pico entre 0,1 – 1,0 μm e entre 1 - 10 μm , além de uma região mínima entre 1-2 μm . Com base nessa distribuição, o MP foi classificado em grupos por faixas de tamanho que possuem diferentes propriedades e origens (Finlayson-Pitts e Pitts, 2000).

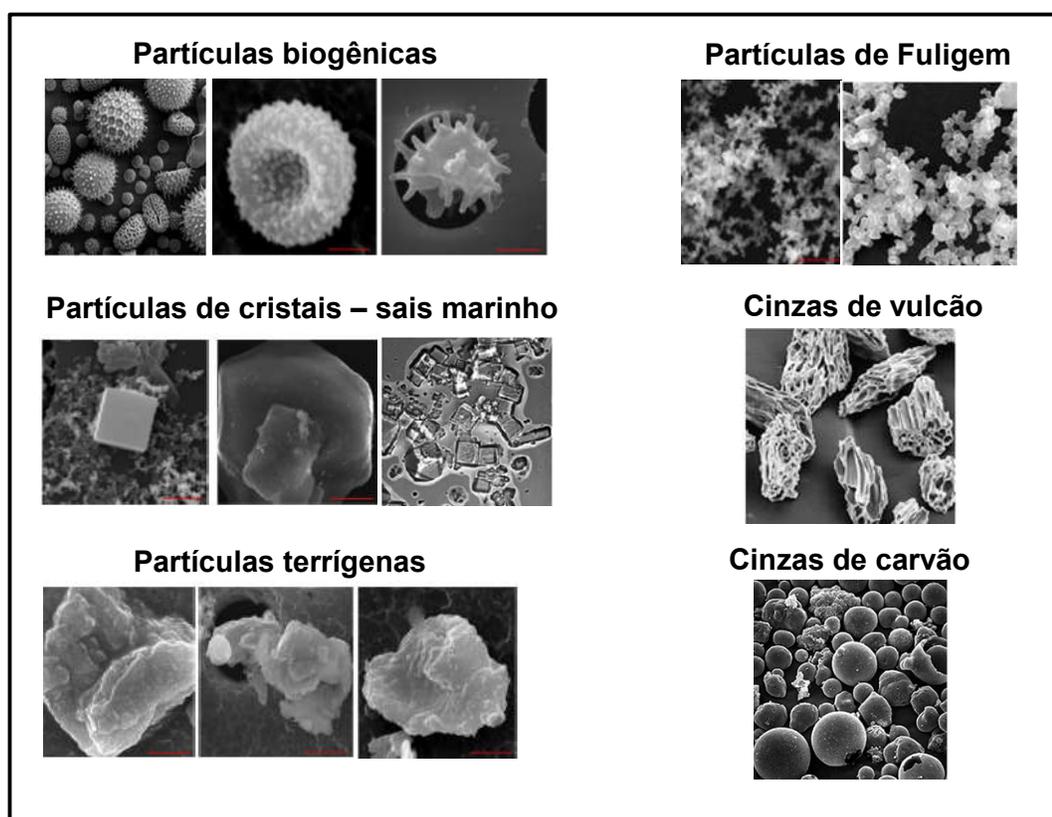


Figura 2 – Algumas estruturas e componentes do Material Particulado Atmosférico. Imagens de microscopia eletrônica de Ferreira et al. (2011).

As partículas totais em suspensão (PTS) compreendem todos os diâmetros de partículas suspensas na atmosfera (Figura 3), entretanto, partículas maiores que 30-70 μm permanecem

suspensas por um curto período (Englert, 2004). Assim, para fins práticos, o PTS é definido pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (1997) como o particulado em suspensão de até 50 μm coletados em amostradores de grandes volumes de ar. O material particulado com diâmetro inferior a 10 μm compreende a fração inalável do ar, sendo subdividido em: partículas inaláveis grossas (MP10), com diâmetro de 2,5 -10 μm ; partículas inaláveis finas (MP2,5) com tamanho inferior a 2,5 μm ; e partículas ultrafinas (UF), menores do que 0,1 μm . As frações menores de particulados estão contidas nas maiores (Englert, 2004).

Os processos de sedimentação e precipitação removem as partículas maiores da atmosfera algumas horas após a emissão, entretanto, as partículas menores que 2,5 μm podem permanecer em suspensão por dias ou mesmo algumas semanas. Conseqüentemente, essas partículas podem ser transportadas por longas distâncias, enquanto o particulado grosso em suspensão encontra-se mais próximo as fontes de emissão (WHO, 2005).

As frações de PTS e MP10 são compostas principalmente de elementos da crosta terrestre, sais marinhos e elementos biológicos, sendo formadas especialmente através de processos mecânicos de erosão, ressuspensão e desintegração de partículas maiores. Já as partículas inaláveis finas (MP2,5) e ultrafinas (UF) são constituídas primariamente de metais e hidrocarbonetos. Processos de combustão e reações secundárias na atmosfera são os mecanismos predominantes de formação destas partículas (De kok et al., 2006; Squadrito et al., 2001).

A fração inalável do material particulado atmosférico representa um risco potencial para a saúde humana, principalmente, devido a sua capacidade de penetrar e depositar nas vias aéreas respiratórias. Seus níveis no ambiente têm sido relacionados com a ocorrência de infecções respiratórias agudas, doenças pulmonares e cardiovasculares crônicas, câncer no sistema respiratório e elevação nas taxas de mortalidade na população (Vargas, 2003). Efeitos adversos à infância incluem nascimentos prematuros, baixo peso ao nascer e aumento da mortalidade pós-natal (Feng et al., 2016). Estudos recentes têm evidenciado, ainda, que o MP2,5 contribui para a incidência e o desenvolvimento de diabetes mellitus, através da indução de resistência a insulina e de inflamação adiposa visceral (Feng et al., 2016; Weinmayr et al., 2015); e também sua associação com a ocorrência de transtorno depressivo e sintomas de ansiedade (Pun et al., 2016; Kim et al., 2016).

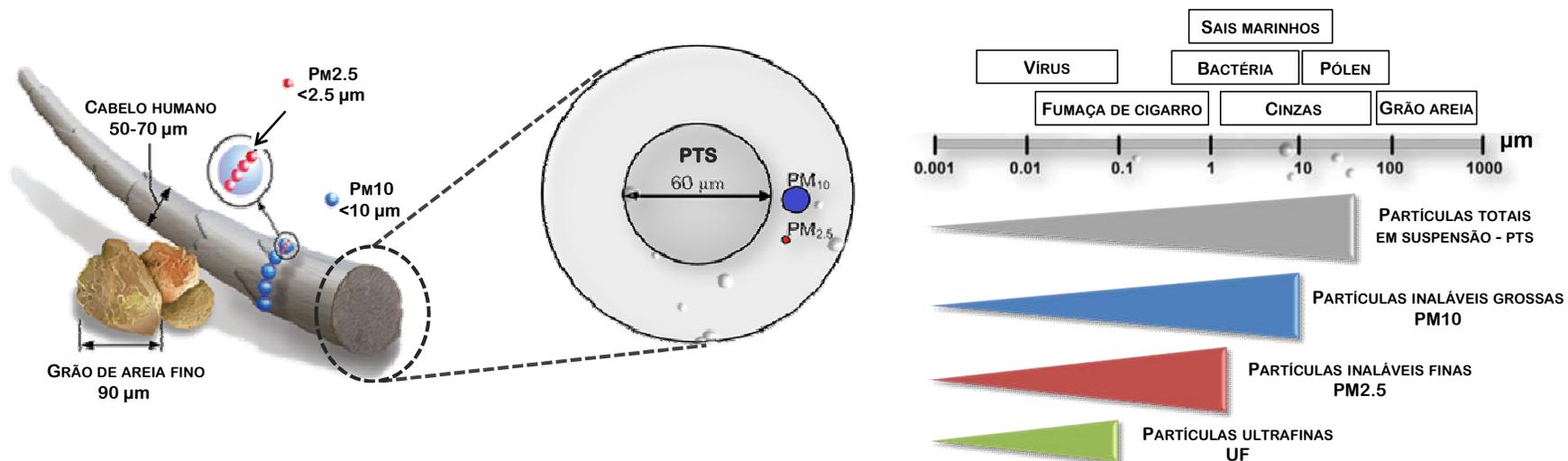


Figura 3 - Classificação do material particulado atmosférico de acordo com seu diâmetro aerodinâmico. Adaptado de <https://www.epa.gov>.

A profundidade de penetração das partículas no sistema respiratório é função de seu tamanho aerodinâmico (Figura 4). As partículas maiores que $10\mu\text{m}$ (PTS) são filtradas ou depositadas na região extratorácica do trato respiratório, constituída pelas vias nasal e oral, faringe e laringe. A retenção de partículas na região extratorácica é considerada a primeira forma de defesa contra a penetração mais profunda do MP, mas também torna esta região mais suscetível a infecções, respostas tóxicas e doenças respiratórias. Somente as partículas menores que $10\mu\text{m}$ penetram na região intratorácica do sistema respiratório, que é dividida em região traqueobronquial e região alveolar. As partículas MP10 depositam-se principalmente na região traqueobronquial, enquanto as partículas de tamanho $<2,5\mu\text{m}$ podem atingir a região alveolar (Claxton et al., 2004; Lopes e Andrade, 1996; Squadrito et al., 2001). Parte do MP2,5 inalado fica retido no pulmão, correspondendo a 96% das partículas observadas no parênquima pulmonar de humanos saudáveis (Churg e Brauer, 1997). Ao atingir a região alveolar, onde ocorre a troca gasosa, o MP2,5 pode ultrapassar a barreira respiratória diretamente ou após ingestão por macrófagos, assim entrando na corrente sanguínea e se espalhando pelo corpo (Mills et al., 2009). Diferentes órgãos sofrem efeitos adversos induzidos principalmente por mecanismos inflamatórios, de estresse oxidativo e através da genotoxicidade (Feng et al., 2016).

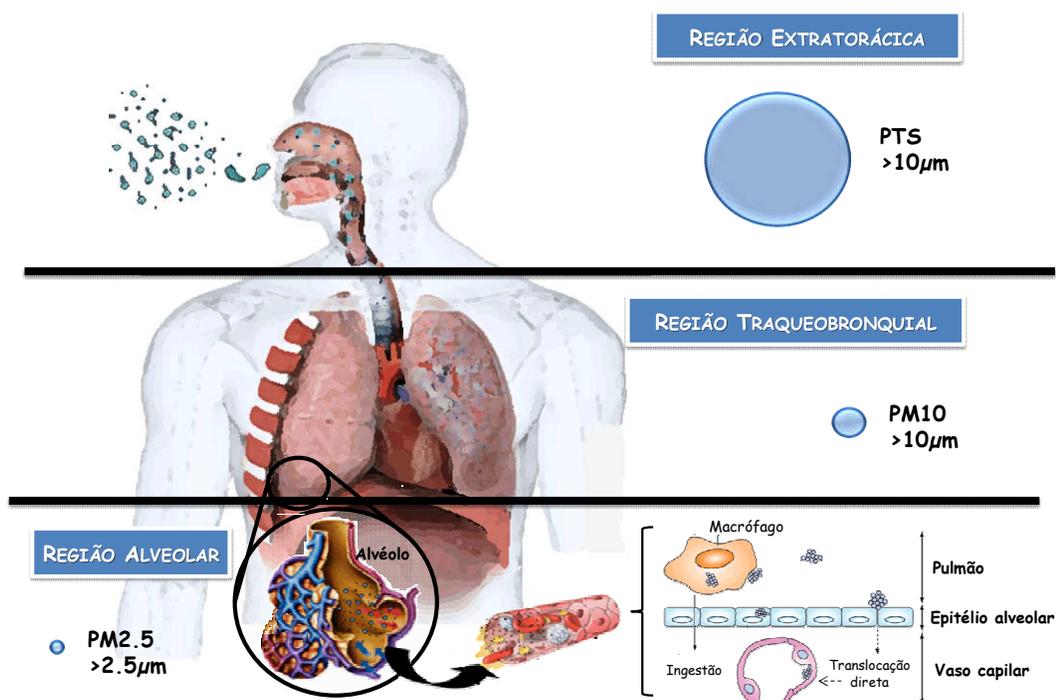


Figura 4 – Profundidade de penetração de partículas atmosféricas no trato respiratório humano. Adaptado de Lippmann (2010), Mills et al. (2009).

Apesar de a saúde humana ser a principal preocupação nas investigações acerca do material particulado, a presença deste poluente na atmosfera ocasiona uma série de consequências adversas ao ambiente, entre as quais podemos citar (Grantz et al., 2003; Guderian, 1977; Van Dingenen et al., 2004):

- 1- Danos a monumentos e materiais por descoloração, erosão, corrosão e decomposição devido à deposição de partículas na sua superfície;
- 2- Alteração na visibilidade da atmosfera e diminuição da radiação solar incidente na superfície terrestre, podendo influenciar as reações químicas dependentes de luz solar;
- 3- Efeitos climáticos como resfriamento e aumento na formação de nuvens;
- 4- Danos à vegetação através de injúrias foliares, redução da fotossíntese ou da captação de nutrientes e redução no crescimento ou reprodução;
- 5- Contaminação do solo e corpos hídricos com substâncias tóxicas presentes nas partículas, podendo acarretar em modificações na química ambiental e ciclagem de nutrientes após a deposição do particulado;
- 6- Expansão de áreas desmatadas;
- 7- Perturbação de ciclos biogeoquímicos;
- 8- Perturbações na estabilidade dos organismos e redução da habilidade de auto-regulação.

De acordo com a USEPA (2008), o monitoramento do material particulado fornece dados para propósitos variados da gestão da qualidade do ar, entre os quais são citados: caracterizar sua qualidade; verificar o cumprimento dos padrões legais; apoiar análises de avaliações de exposição, riscos à saúde e ao bem estar; desenvolver e avaliar estratégias de controle de emissões e acompanhar o progresso dos programas de controle da poluição atmosférica. Na tentativa de minimizar os efeitos adversos provocados pelo material particulado atmosférico, várias agências reguladoras e organizações não governamentais propuseram limites máximos para a concentração deste poluente no ambiente. A principal destas agências, a Organização Mundial de Saúde, recomenda limites máximos diários e anuais para MP10 e MP2,5 (WHO, 2006).

No Brasil, a resolução CONAMA n°003/1990 estabelece padrões primários e secundários da qualidade do ar (Brasil, 1990). Os padrões primários referem-se às concentrações de poluentes que, se ultrapassadas, poderão afetar a saúde da população. Determinam os níveis máximos de poluentes tolerados, constituindo metas de curto e médio prazo. Já os padrões secundários são mais restritivos, sendo definidos como as concentrações de poluentes abaixo das quais se prevê o mínimo efeito adverso sobre o bem-estar da população, assim como o mínimo dano à fauna, à flora, aos materiais e ao meio ambiente em geral. Esses padrões podem ser entendidos como os níveis desejados da concentração de poluentes, estabelecendo metas de longo prazo. Os padrões de material particulado atmosférico compreendidos nesta resolução referem-se às partículas totais em suspensão e às partículas inaláveis grossas, inexistindo regulamentações acerca da concentração de partículas MP2,5 (Tabela 1).

Tabela 1 – Limites de material particulado atmosférico, em $\mu\text{g}/\text{m}^3$, estabelecidos pela Legislação Brasileira (CONAMA) e Organização Mundial de Saúde (OMS)

Poluente	Amostragem	CONAMA n°003/1990		OMS
		Padrão primário	Padrão secundário	WHO, 2006
PTS	24 horas	240	150	-
	Anual	80	60	-
MP10	24 horas	150	150	50
	Anual	50	50	20
MP2,5	24 horas	-	-	25
	Anual	-	-	10

Com o aumento de estudos demonstrando os efeitos adversos das partículas inaláveis, maior atenção passou a ser dada às frações de MP10 e MP2,5. De fato, a legislação ambiental norte-americana substituiu a regulamentação da concentração de PTS por MP10 em revisão do “*National Ambient Air Quality Standards*” (NAAQS) em 1987. A versão original da NAAQS que considerava as partículas totais em suspensão datava de 1971. Padrões de MP2,5 foram adicionados à NAAQS em 1997, e atualizados em 2006, quando concentrações máximas mais restritivas foram estabelecidas (USEPA, 2008; 2010). Outros países também vêm adotando padrões para MP2,5, como Canadá, União Européia, Austrália, Reino Unido, Japão, Índia, México e Peru, entre outros (Santana et al., 2012).

1.2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem um grupo de substâncias químicas composto exclusivamente de carbono e hidrogênio que contem dois ou mais anéis aromáticos condensados (Barra et al., 2007; Pereira Netto et al., 2000) Os HPAs são contaminantes amplamente distribuídos no ambiente, sendo emitidos quando ocorre a queima incompleta de matéria orgânica, tanto de origem natural quanto antropogênica. As fontes de emissão antrópica compreendem a queima de combustíveis fósseis, derramamentos de óleos e seus subprodutos, incineração de resíduos e fumaça de cigarros. As fontes naturais incluem a queima de biomassa em florestas e erupções vulcânicas (Lopes e Andrade, 1996; Manahan, 2003).

Estas substâncias são encontradas em diferentes níveis de concentração em todos os compartimentos ambientais e na biota. São poluentes preocupantes por possuírem difícil degradação no meio ambiente, sendo considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs). Quando presentes na atmosfera, os HPAs podem estar tanto na fase gasosa como associados ao material particulado. A concentração de HPAs em cada fase dependerá da volatilidade e afinidade pelas superfícies das partículas atmosféricas de cada composto. A volatilidade destes compostos depende de seu peso molecular, diminuindo conforme o aumento do peso (Pereira Netto et al., 2000). Dessa forma, HPAs de baixo peso molecular estão mais disponíveis na fase gasosa, enquanto os de alto peso molecular estão principalmente associados com o particulado atmosférico (Akyuz e Cabuk, 2010).

O comportamento dos HPAs na atmosfera depende de reações físico-químicas complexas, interações com outros poluentes, transformações fotoquímicas e deposições seca e

úmida (Lopes e Andrade, 1996). Essas reações químicas podem ocorrer tanto na fase gasosa quanto na particulada, com a formação de derivados nitrogenados e oxigenados. Estes derivados também possuem ampla ocorrência, mas em geral ocorrem em concentrações ambientais cerca de 100 a 1000 vezes inferiores às dos HPAs (Lopes e Andrade, 1996; Pereira-Netto et al., 2000). Representam um problema global por serem transportadas por longas distâncias através da atmosfera e apresentar características genotóxicas (Barra et al., 2007; Meire et al., 2007). Vários HPAs apresentam características citotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (IARC, 2010), e alguns foram reconhecidos recentemente como disruptores endócrinos (WHO, 2013). HPAs e seus derivados estão associados ao aumento da incidência de diversos tipos de cânceres ao Homem (Pereira Netto et al., 2000).

Existem mais de 100 espécies de HPAs diferentes, geralmente ocorrendo em misturas complexas de substâncias ao invés de compostos simples (ATSDR, 1995). Os HPAs são considerados como poluentes prioritários pela Agência de Proteção ambiental dos Estados Unidos (USEPA), que listou 16 compostos como particularmente importantes no monitoramento ambiental (Figura 5): Acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(ghi)perileno, benzo(k)fluoranteno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3-cd)pireno, naftaleno e pireno. Esses compostos apresentam de 2 a 6 anéis aromáticos fundidos entre si, com peso molecular variando entre 128 e 278 g/mol (Meire et al., 2007). Ainda, a IARC (2016), agência internacional de pesquisa em câncer (*International Agency for Research on Cancer*), classifica oito destes compostos como possíveis (Grupo 2B: benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, criseno, indeno(1,2,3-cd)pireno e naftaleno), prováveis (Grupo 2A: dibenzo(a,h)antraceno) ou carcinogênicos (Grupo 1: benzo(a)pireno) para humanos.

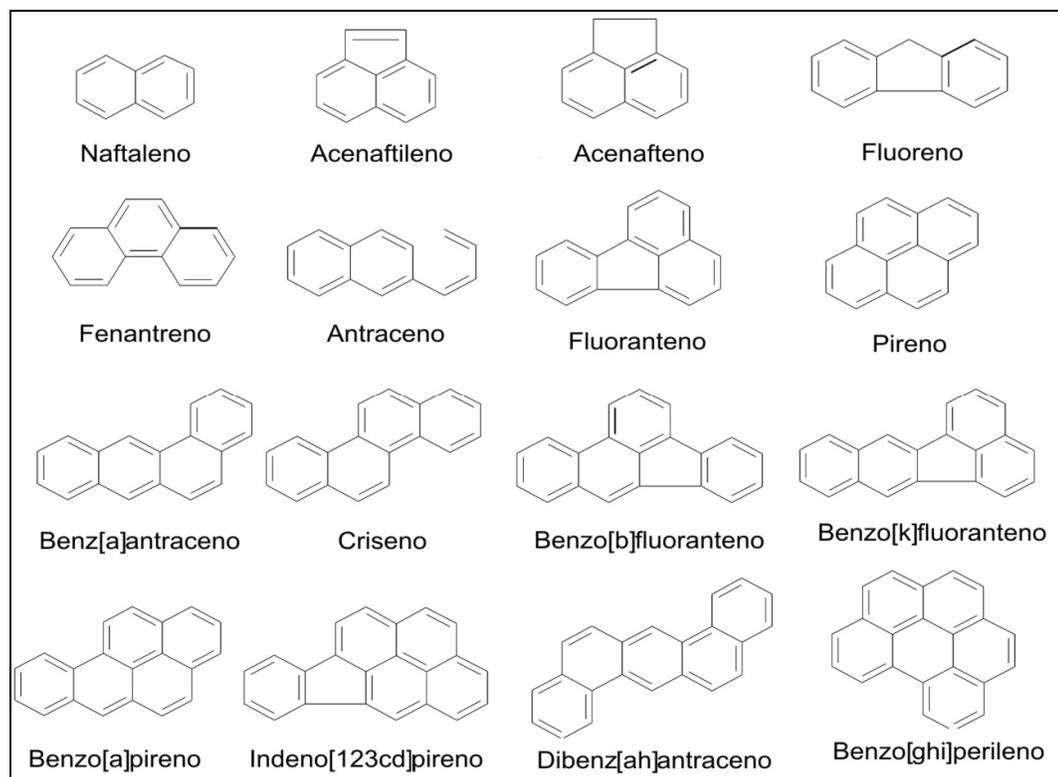


Figura 5 – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos considerados prioritários pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos. Fonte: Meire et al. (2007).

O Benzo(a)pireno, (B(a)P), é a espécie de HPA mais bem investigada e é considerada como boa indicadora de riscos à saúde humana pela exposição ambiental a estes hidrocarbonetos, devido seu alto potencial carcinogênico (Albuquerque et al., 2016; Bostrom et al., 2002). Sua presença no ar ambiente é utilizada pela União Européia como marcador do risco carcinogênico dos HPAs, sendo estabelecida a concentração máxima de $1\text{ng}/\text{m}^3$ no material particulado atmosférico (EEC, 2004). Entretanto, estimar o risco carcinogênico de uma mistura complexa de contaminantes como o material particulado atmosférico, com base na mera determinação do B(a)P pode ser insuficiente (Mugica et al., 2012; Silva et al., 2010). Albuquerque et al. (2016), em estudo sobre o potencial carcinogênico do ar ambiente da cidade do Porto (Portugal) durante uma década, verificaram contribuição de 13 à 43% do B(a)P, indicando que a avaliação do B(a)P isoladamente leva a subestimativas do potencial carcinogênico de misturas de HPAs.

O Fator de Equivalência Tóxica (TEF = *Toxic equivalency factors*) expressa em um único número à potência tóxica dos HPAs na forma do seu composto mais carcinogênico (B[a]P), podendo ser utilizado como ferramenta prática para fins de avaliação e controle ambiental

(Bostrom et al., 2002). Multiplicando a concentração de cada HPA individual no ar por seu respectivo fator de toxicidade, obtém-se o quociente de toxicidade equivalente, como na equação:

$$\Sigma TEQ = \Sigma C_i \times TEF_i$$

Onde: TEQ = Quociente de toxicidade equivalente, C_i =concentração individual do HPA, TEF = Fator de toxicidade equivalente relativo ao B(a)P.

Em uma mistura de HPAs, o TEQ total pode ser relacionado com o aumento potencial do risco de câncer (Silva et al., 2010).

Diversas abordagens foram utilizadas para determinar TEFs individuais, com valores propostos para cerca de 27 HPAs. USEPA, (2010) apresenta uma revisão sobre a aplicação de TEFs como indicativo de potencial carcinogênico para HPAs ao longo do tempo (Tabela 2), com as bases utilizadas por diferentes autores para calcular estes valores de referência. Neste documento, evidencia-se que os primeiros trabalhos basearam-se em poucos estudos, ou estudos com o risco calculado de apenas uma fonte de exposição, sendo substituídos conforme novos dados foram adicionados. As diversas abordagens geralmente se baseiam em dados de bioensaios e métodos de modelagem similares, resultando em valores de TEFs considerados comparáveis para a maioria das análises de HPAs (USEPA, 2010). Dessa forma, os TEFs não representam valores verdadeiros ou absolutos, e devem ser usados com cuidado, embora estejam baseados nos melhores dados disponíveis, que em muitos casos são escassos (Bostrom et al., 2002).

Como apontado por Slezakova et al. (2013), os estudos tipicamente utilizam os valores de TEF estimados por Nisbet e LaGoy (1992). De fato, em pesquisa na base de dados SCOPUS sobre trabalhos utilizando TEFs para HPAs no ar, mais de 70% dos estudos encontrados utilizaram os valores propostos por estes autores (palavras chaves pesquisadas: TEF + PAH + PM2.5/ PM10/ TSP/ ambiente air/ outdoor air; resultando no total de 18 artigos sobre o tema).

Tabela 2 – Fatores de Equivalência Tóxica (TEFs) para hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) selecionados de acordo com diferentes autores (Fonte: USEPA, 2010).

Parâmetro	Clements (1988)	Nisbet e Lagoy (1992)	USEPA (1993)	Meek et al. (1994)	Muller et al. (1997)	Collins et al. (1998)
Naftaleno		0,001				
Acenaftileno		0,001				
Acenafteno		0,001				
Fluoreno		0,001				
Fenantreno		0,001			0,00064	
Antraceno		0,01				
Fluoranteno		0,001				
Pireno	0,081	0,001			0	
Benzo(a)antraceno	0,145	0,1	0,1		0,014	0,1
Criseno	0,001	0,01	0,001		0,026	0,01
Benzo(b)fluoranteno	0,14	0,1	0,1	0,06	0,11	0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,0044	0,1	0,1	0,04	0,037	0,1
Benzo(a)pireno	1	1	1	1	1	1
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,232	0,1	0,1	0,12	0,067	0,1
Dibenzo(a,h)antraceno	1,11	5	1		0,89	
Benzo(g,h,i)perileno		0,01			0,012	

Nisbet e LaGoy (1992) propuseram TEFs para 17 HPAs encontrados comumente em sítios contaminados por resíduos perigosos. Os fatores de toxicidade propostos por Clements (1988) foram revisados e alguns compostos tiveram seus TEFs arredondados para uma ordem de magnitude, com a justificativa de assim refletir melhor essas estimativas. Esses fatores basearam-se em análises matemáticas de curvas dose-resposta de estudos sobre carcinogênese em ratos expostos. Os valores de oito compostos (acenafteno, acenaftileno, fluoranteno, fluoreno, 2-metil-naftaleno, naftaleno, fenantreno e pireno), cujas evidências de carcinogenicidade em animais eram limitadas na época, foram estipulados em 0,001. O valor proposto para o dibenzo[a,h]antraceno, derivado da análise de dados relacionados a incidência de tumores de exposições ambientais, foi muito mais elevado que o proposto anteriormente. Novas evidências levaram a classificação do naftaleno à possível carcinogênico (IARC, 2016), entretanto, seu valor de TEF não foi alterado.

É importante salientar que a USEPA (2010), considera inadequado o termo “Fator de equivalência tóxica” quando se trata de HPAs, uma vez que os critérios para a derivação desses fatores não são atendidos. Estritamente falando, TEFs podem ser estabelecidos quando existem dados abundantes apoiando modos de ação específica que são pertinentes a vários

endpoints, rotas e durações no tempo de exposição. No caso dos HPAs, os dados existentes são inadequados, pois se limitam a *endpoints* de câncer. Dessa forma, os autores sugerem o uso do termo “fator de potência relativo” (RPF = Relative potency fator), que considera uma abordagem mais generalizada, limitada aos dados de apenas alguns *endpoints*, rotas ou duração de exposição. Apesar da ressalva considerada por estes autores, o termo TEF é amplamente utilizado para HPAs e será adotado neste estudo.

1.3. Biomarcadores

O monitoramento ambiental é um procedimento que consiste em uma rotina de avaliação e interpretação de parâmetros físicos, químicos e/ou biológicos. A avaliação de áreas impactadas, geralmente é conduzida utilizando medidas físico-químicas, entretanto, a determinação do risco de cada substância efetivamente em uso torna-se inviável devido ao alto custo e às limitações das ferramentas analíticas disponíveis. O estudo toxicológico de amostras ambientais deve acompanhar a diversidade cada vez maior de compostos químicos, sintéticos ou naturais, lançados ao meio, e sua complexidade, uma vez que seus efeitos tóxicos são em sua maioria ignorados (Lemos, 1998; Claxton et al., 1998; Fernandez et al., 2005). Portanto, é recomendada a aplicação de bioensaios para detecção dos efeitos de uma ampla variedade de substâncias químicas (Ohe et al., 2004).

No diagnóstico ambiental, embora a avaliação de substâncias isoladas forneça informações sobre seus efeitos e consequências, é necessário avaliar também o seu efeito após interação com o ecossistema. Os danos biológicos, portanto, podem decorrer do efeito combinado ou sinérgico de compostos químicos lançados ao meio, interagindo com os diferentes fatores do ecossistema estudado (Rand e Petrocelli, 1985). A avaliação de risco embora seja orientada focando a proteção da saúde humana, deve garantir que comunidades bióticas complexas em ecossistemas naturais sejam protegidas se quisermos manter a qualidade do ambiente em que vivemos (Moore et al., 2004).

Os biomarcadores são respostas biológicas correspondentes à exposição dos indivíduos aos agentes químicos e/ou estressores ambientais (Van der Oost et al., 2003), evidenciadas por alterações celulares, bioquímicas ou moleculares medidas em meio biológico como tecidos, células ou fluídos (Hulka et al. 1990; Souza, 2006). Ainda, compreendem a determinação de substâncias, seus produtos de biotransformação e interação com biomoléculas nos organismos (Yusa et al., 2012). Vários parâmetros biológicos podem ser alterados em consequência da

interação entre um agente químico e um organismo. Entretanto, para ser utilizado como biomarcador, é necessário que este parâmetro possa ser determinado quantitativamente e que exista correlação com a intensidade da exposição e/ou do efeito biológico da substância.

Os biomarcadores podem ser divididos em três classes: de exposição, efeito ou susceptibilidade. Os biomarcadores de exposição quantificam uma substância exógena, seus metabólitos ou produtos de interação com biomoléculas, dentro do organismo, para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo à determinada substância. Estabelecem uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna. Os biomarcadores de efeito incluem qualquer alteração nos tecidos ou fluídos de um organismo após a exposição externa e absorção de um composto químico, que possam ser reconhecidas ou associadas com possíveis danos à saúde ou doenças. Já os biomarcadores de suscetibilidade incluem a determinação de fatores genéticos e alterações moleculares que podem alterar a sensibilidade do organismo na resposta a um agente estressor, indicando habilidades inerentes ou adquiridas do organismo (Gonzalez e Kirsh-Volders, 2016).

Normalmente, os poluentes promovem alterações em níveis sequenciais aos sistemas biológicos, iniciando com respostas moleculares e celulares até afetar níveis ecossistêmicos. Conforme mostrado na Figura 6, efeitos em níveis superiores de organização biológica são precedidos por mudanças nos processos biológicos, de forma que os biomarcadores servem como um alerta precoce de efeitos tardios (Bayne et al., 1985; Van der oost et al., 2003).

Biomarcadores de genotoxicidade detectam efeitos causados à molécula de DNA, que devido a universalidade do código genético, são similares a uma variada gama de organismos, sendo importantes ferramentas para a adoção de medidas preventivas aos danos causados pela poluição. Estabelecer os efeitos de substâncias em diferentes níveis de organização biológica é essencial para a compreensão das condições do ambiente, e para prover uma base de prognóstico para melhoramento da qualidade ambiental (Moore et al., 2004).

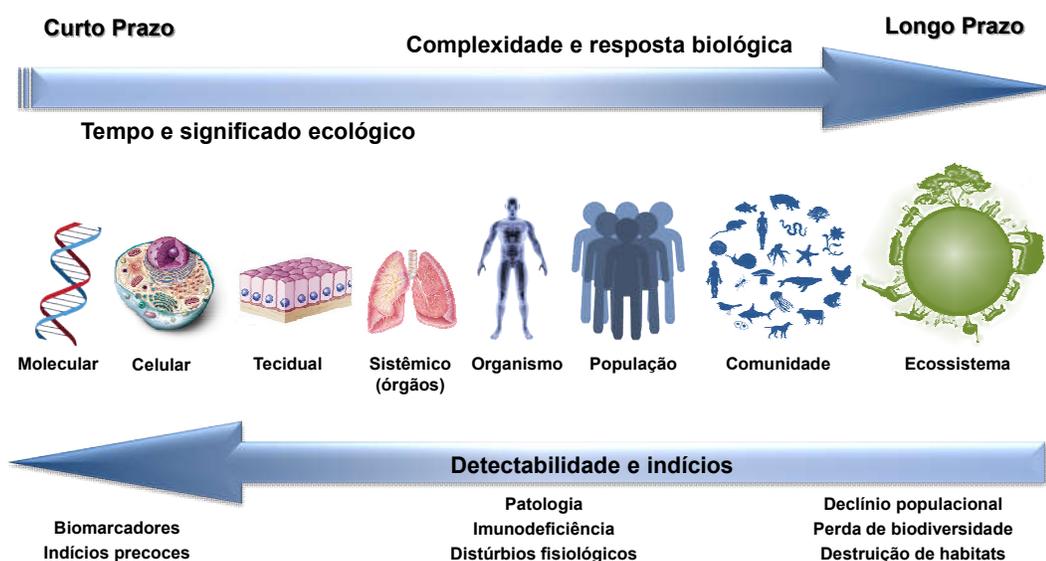


Figura 6 – Sequência de respostas a poluentes estressores em sistemas biológicos. Adaptado de Van der Oost et al. (2003) e Moore et al. (2004).

1.4. Biomonitoramento humano

O biomonitoramento de populações humanas pode fornecer um sistema de detecção precoce para o início da desregulação celular no desenvolvimento de câncer, o que ajudaria a desenvolver programas de prevenção eficientes (Da Silva, 2016).

Exposições crônicas a poluentes químicos geralmente apresentam impactos graduais, difíceis de serem diferenciados de processos e efeitos de modificações ambientais naturais (Moore et al., 2004). Uma vez que respostas compensatórias tenham sido ativadas, a adaptabilidade de um organismo já pode estar comprometida, devido à redução da sua capacidade de responder a novas mudanças ambientais (Depledge e Fossi, 1994). Quando os efeitos dessas exposições finalmente se tornam evidentes, em níveis mais complexos de organização biológica, o processo degenerativo pode ter ultrapassado o ponto passível de reversão. Os biomarcadores podem ser usados na atividade de monitoramento para confirmar exposições individuais ou de uma população a uma determinada substância química e avaliar o risco, quando comparados com uma referência (Moore et al., 2004).

O Biomonitoramento humano tem sido aplicado como ferramenta bem sucedida no estudo da exposição e avaliação de risco de poluentes. Tornou-se um instrumento cada vez mais relevante para: a) avaliar os riscos potenciais para a saúde associados à exposição a poluentes

químicos ambientais; b) identificar novas exposições químicas; c) estabelecer qual a distribuição da exposição entre a população em geral, identificando grupos vulneráveis e populações com exposições mais elevadas; d) determinar se novas tecnologias podem afetar a saúde humana; f) realizar estudos epidemiológicos; e (g) avaliar a eficácia das ações regulatórias (Yusa et al., 2015; Needham et al., 2007).

A absorção de substâncias químicas ambientais ocorre por três vias principais - absorção dérmica, inalação e ingestão - que levam a uma concentração interna ou carga corporal do poluente químico (Needham et al., 2007). A carga corporal é determinada pelas propriedades físicas e químicas da substância, tempo de exposição e as características fisiológicas do indivíduo (susceptibilidade individual), sendo a carga final o resultado da absorção, distribuição, metabolismo e excreção (Esteban e Castaño, 2009). Uma vez absorvido, o produto químico pode ser tratado pelo organismo de maneiras diferentes, como por exemplo: ser excretado sem transformação, metabolizado e excretado, armazenado e excretado lentamente ou submetido a uma combinação de todos estes processos (Needham et al., 2005). As propriedades da variabilidade química e individual determinarão a magnitude destes processos e o destino final do composto químico. Uma grande vantagem do biomonitoramento humano é permitir avaliar todas as vias de absorção e todas as fontes de exposição relevantes para a absorção humana (Angerer et al., 2007).

Geralmente, os riscos associados a determinados poluentes ambientais são considerados idênticos para todos os indivíduos expostos e as taxas basais de mortalidade, morbidade e cuidados à saúde são estabelecidas como uniformes em grandes áreas geográficas, usualmente como médias nacionais (Levy et al., 2002). No caso da poluição atmosférica não é diferente, e os limites de qualidade do ar são definidos para a população em geral. Entretanto, diferentes níveis de risco e suscetibilidade podem ser observados na população, e a definição de subpopulações ou grupos sensíveis é importante para embasar critérios de qualidade específicos. Os grupos com maior risco de exposição, no caso da poluição do ar, incluem idosos, crianças, recém-nascidos, gestantes, pessoas com alergias ou doenças pulmonares e cardíacas e populações carentes (Peled, 2011).

1.5. Biomonitoramento em crianças

A infância caracteriza-se como o período de maior suscetibilidade aos efeitos danosos da poluição atmosférica. O epitélio das vias respiratórias de crianças em fase de crescimento é

mais permeável aos poluentes do ar, e suas defesas contra a ação de partículas e gases não está completamente desenvolvida (Salvi, 2007).

Após o nascimento, o pulmão continua seu desenvolvimento, com o surgimento de novos alvéolos e sua expansão ao longo da infância. Ao nascer, possuímos cerca de 24 milhões de alvéolos, que aumentam para 267 milhões durante os quatro primeiros anos de vida, alcançando 600 milhões até a vida adulta (Salvi, 2007; Grigg, 2009).

A maior vulnerabilidade das crianças aos efeitos agudos e crônicos de poluentes ambientais envolve muitos fatores, mas segundo Wild e Kleinjans (2003), estes podem ser agrupados em três grandes áreas: a) maior exposição/absorção as toxinas ambientais relativamente aos adultos; b) dose biologicamente ativa, pois pode haver diferenças na quantidade de toxinas que atingem o órgão alvo; c) a precocidade da exposição, que permite muito tempo para que esta se torne crônica, e que os efeitos adversos à saúde se manifestem.

Quando expostas a um mesmo contexto ambiental e durante o mesmo tempo que adultos, as crianças podem apresentar profundas diferenças na absorção de substâncias químicas. Isso ocorre devido a maior ingestão de ar, água e comida, em relação ao seu tamanho corporal. A cada quilograma de peso, o consumo diário de ar por uma criança foi estimado em 2,3 vezes maior que em adultos, o consumo de água e comida – 4,8 vezes e 6,1 vezes maior, respectivamente (Armstrong et al., 2002).

As maiores taxas metabólicas de consumo de oxigênio apresentada pelas crianças durante o repouso ocorrem devido a sua maior área superficial por unidade de massa corporal e ao seu rápido crescimento. Além disso, a área superficial do pulmão/kg é menor, fazendo com que o maior volume de ar respirado atinja uma menor área de tecido pulmonar (Moya et al., 2014). Relativamente à poluição atmosférica, essas maiores taxas de respiração aumentam os riscos de danos causados pelo material particulado (Grigg, 2009), sendo que a deposição de partículas atmosféricas por área de tecido pulmonar é 35% maior em crianças do que em adultos (Bennet e Zeman, 1998).

As crianças também apresentam padrões de comportamentos específicos que podem aumentar sua exposição aos poluentes ambientais, como o hábito de levar objetos e as mãos à boca e de engatinhar no solo. Quanto à poluição do ar, o hábito de permanecerem mais tempo ao ar livre e praticarem mais atividade física do que os adultos, pode ter implicações para o

risco de exposição a toxinas. Durante o exercício físico, por exemplo, ocorre um incremento de cinco vezes na deposição de partículas atmosféricas nos pulmões, em relação ao repouso (Salvi, 2007).

Além das diferenças na exposição, as respostas fisiológicas da criança a uma substância química pode diferir da encontrada em adultos, afetando a absorção e disposição de agentes exógenos (Strolin e Baltes, 2003). Um exemplo é representado por algumas enzimas de metabolização de fase I e fase II, cuja expressão varia conforme a idade do indivíduo, tornando as crianças com suscetibilidade alterada a genotoxinas ambientais (Wild e Kleinjans, 2003).

A ocorrência de um dano prematuro (genético ou outro) permite maior tempo de vida para o aparecimento de prejuízos à saúde do indivíduo (Mørck et al., 2016). Os poluentes inalados na fase infantil podem modificar a taxa de crescimento normal da função pulmonar, e conseqüentemente, ficar reduzida na vida adulta (Grigg, 2008). O atraso no desenvolvimento do pulmão e sua função prejudicada, devido à poluição do ar, são fatores de risco para o aparecimento de doenças respiratórias na fase infantil e adulta (Grigg, 2009).

O material particulado atmosférico exerce um efeito danoso pequeno, mas contínuo, durante o desenvolvimento da função pulmonar na infância. Estudos com crianças vivendo em áreas com altos níveis de poluentes atmosféricos mostraram evidências de modificações na estrutura da mucosa das vias respiratórias, que possuíam menor habilidade de defesa, deixando o organismo mais vulnerável a gases reativos e partículas finas (Salvi, 2007).

Com base no exposto, Wild e Kleinjans (2003) concluem que há uma base científica para a preocupação e atenção especial a vulnerabilidade das crianças aos carcinógenos ambientais, sendo que um maior foco em pesquisas nessa área são justificados. Assim como, também são importantes estudos em áreas isentas ou com menor grau de poluição atmosférica para possibilitar a comparação das respostas basais da população (Silva et al., 2015).

1.6. Ensaio de genotoxicidade utilizados no estudo

1.6.1. Ensaio *Salmonella*/microsoma

Um ensaio amplamente utilizado em biomonitoramento ambiental é o Teste *Salmonella*/microsoma (Teste de Ames) que permite identificar, tanto substâncias puras,

como misturas complexas causadoras de danos genéticos. Este teste foi especificamente desenvolvido para detectar mutagênese quimicamente induzida, tornando-se amplamente utilizado como método de triagem inicial do potencial genotóxico de novas drogas e biocidas, sendo reconhecido pela comunidade científica e agências de controle (Mortelmans e Zeiger, 2000). Já foi estabelecido que existe uma alta correlação entre resposta mutagênica medida no ensaio *Salmonella* e carcinogênese avaliada em roedores, variando de 77% a 90%, dependendo principalmente do grupo químico ao qual a substância estudada pertence (McCann et al., 1975; Mortelmans e Zeiger, 2000; Zeiger, 1998). Esse ensaio baseia-se em linhagens de *Salmonella typhimurium* que contêm uma mutação específica no operon da histidina, o que as torna incapazes de sintetizar este aminoácido (*his*⁻) e crescer em sua ausência no meio de cultura. Novas mutações nesses sítios podem restaurar a função dos genes permitindo que as células sintetizem histidina. Dessa forma, quando semeadas em meio de cultura livre desse aminoácido, apenas as células que reverterem espontaneamente (*his*⁺) formarão colônias. Os valores de mutações espontâneas são relativamente constantes para cada linhagem, entretanto, se uma substância mutagênica é adicionada ao meio de cultura os valores de mutação podem aumentar significativamente (Claxton et al., 1987; Umbuzeiro e Vargas, 2003).

Ao contrário do que ocorre em mamíferos e outros vertebrados, as bactérias são incapazes de metabolizar substâncias via citocromo P450. A função primária do sistema de metabolização hepática é proteger a célula, degradando e detoxificando substâncias estranhas ao organismo. Entretanto, alguns compostos mutagênicos (pró-mutágenos) são inativos a não ser que sejam metabolizados a formas ativas. Por isto, um sistema exógeno de ativação metabólica de mamíferos é incluído aos ensaios. Esse sistema, conhecido como S9 mix, é preparado a partir de células de fígado de ratos *Sprague-Dawley* que foram previamente tratados com um indutor enzimático (Aroclor 1254). Dessa forma, é possível mimetizar o metabolismo de mamíferos e analisar a genotoxicidade dos metabólitos resultantes dos compostos testados. A ativação metabólica das amostras com essas enzimas aumentam a correlação entre a mutagênese observada nesse ensaio e a carcinogênese em mamíferos. (Claxton et al., 1987; Maron e Ames, 1983; Umbuzeiro e Vargas, 2003).

Este bioensaio tem se mostrado apropriado para avaliação rápida da disponibilidade e atuação de contaminantes provenientes de matrizes ambientais complexas. Sua utilização tem se mostrado útil para prevenção e investigação de problemas ambientais. Segundo Claxton et

al. (2010) o ensaio *Salmonella* foi essencial para o reconhecimento de agentes mutagênicos em amostras ambientais, permitindo que os pesquisadores descobrissem que grande parte do nosso ambiente possui agentes com atividade mutagênica. Atualmente, esta é a metodologia mais empregada na avaliação da mutagenicidade de matrizes ambientais complexas, contando com aproximadamente 37% do total de estudos em solos (White e Claxton, 2004), 41% em sedimentos (Chen e White, 2004), 37% em ar (Claxton e Woodall, 2007) e 50% em água (Ohe et al., 2004).

Em recente revisão, Claxton et al. (2010) analisaram o número de trabalhos publicados por ano que utilizaram o Teste de Ames em vários tipos de amostras ambientais. Os autores observaram que estudos sobre produtos naturais, água e ar compõem a maioria das publicações atuais. White e Claxton (2004) atribuíram o extenso uso do ensaio *Salmonella* em amostras de material particulado atmosférico a características da metodologia, como: a) possibilidade de utilizar pequenas quantidades de amostra; b) realizar o diagnóstico através do uso de diferentes linhagens e protocolos; c) simplicidade e difusão em muitos laboratórios; d) rapidez e baixo custo, se comparado com outros métodos analíticos.

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

1.6.2. Ensaio cometa

O Ensaio Cometa ou Eletroforese em gel de célula única (“*Single cell gel electrophoresis assay*”) é um método para estudos genotóxicos *in vivo* ou *in vitro*, aplicável a qualquer célula eucariótica, independente de estarem em proliferação ou não, bastando apenas uma boa suspensão celular (Valverde e Rojas, 2009). Em condições alcalinas (> pH 13), o ensaio cometa pode detectar quebras ao DNA de fita simples e dupla, resultantes, por

exemplo, de interações diretas com o DNA, sítios álcali-lábeis, erros de reparo de excisão de bases. Estas quebras podem ser reparadas, resultando em nenhum efeito persistente; podem ser letais para a célula; ou ainda podem ser fixadas em mutações resultando em mudanças viáveis permanentes. Podem também conduzir a danos cromossômicos associados a doenças humanas incluindo o câncer (OECD, 2016).

Uma suspensão de células é misturada com agarose formando um gel fino e colocada sobre uma lâmina de microscópio. Este material é exposto a uma solução de lise capaz de remover membranas celulares e nucleares, liberando todos os componentes celulares solúveis, além de remover as histonas do DNA. O resultado são corpos embebidos em gel que se assemelham a núcleos celulares em tamanho e forma, sendo conhecidos como nucleóides. A organização nucleosomal do DNA é interrompida pela extração das histonas, mas o seu super-enrolamento negativo (imposto pelo enrolamento em super hélice do DNA ao redor da histona) se mantém, desde que o DNA esteja intacto. Uma ruptura na fita de DNA relaxa o super-enrolamento. Ao submeter a lâmina com nucleóides a um campo eletroforético, esse DNA relaxado é atraído para o ânodo, causando sua migração no gel de agarose. Quanto mais rupturas estiverem presentes no DNA, mais laços estarão relaxados e sofrerão migração, resultando em uma imagem semelhante a um cometa celeste. Após coloração adequada da lâmina, a intensidade de fluorescência apresentada pela “cauda” do cometa é medida como um índice de frequência de quebra no DNA (Azqueta e Collins, 2013).

Nem todos os agentes genotóxicos causam quebras diretas ao DNA; Agentes alquilantes, oxidantes e irradiação UV, causam alterações de bases que podem ser convertidas em rupturas por incubação dos nucleóides com glicosilases ou endonucleases específicas da lesão (Collins, 2015). Dessa forma, modificações do método tradicional, com adição de enzimas específicas, vêm sendo introduzidas para permitir a medição de outros danos (Langie et al., 2015).

A análise microscópica dos cometas pode ser realizada visualmente, por classes de dano (variando de 0, nenhum dano, a 4, dano máximo), ou através de programas de análise de imagem. Neste último, o parâmetro intensidade de cauda é o mais útil, medindo a porcentagem de DNA na cauda, que está linearmente relacionado com a frequência de quebras (Kumaravel et al., 2009).

O ensaio cometa pode ser usado para investigar a genotoxicidade de substâncias químicas de origem industrial, biocidas, agroquímicos e medicamentos (Hartmann et al., 2003), e vem sendo amplamente utilizado em estudos de biomonitoramento ambiental e humano e em de processos de reparo no DNA. Entre 1990 e 2016, cerca de 10.000 artigos foram publicados utilizando este ensaio, incluindo 270 revisões (Glei et al., 2016). Estudos utilizando o ensaio cometa em biomonitoramento humano vêm crescendo nos últimos anos, sendo a maioria das avaliações de efeitos de exposições ocupacionais. Estudos de exposição ambiental contabilizam cerca de 23% dos trabalhos realizados (Valverde e Rojas, 2009).

Kirkland e Speit (2008) verificaram resultados positivos no ensaio cometa para 90% de um total de 67 substâncias químicas carcinogênicas. Além disso, 78% de compostos não-cancerígenos apareceram como negativos no ensaio, sendo identificados corretamente e dando um risco razoavelmente baixo de "falsos positivos". Em estudos de biomonitoramento humano avaliando exposições ambientais, houve alta correlação (71%) entre a presença de danos identificados pelo ensaio cometa e por outro biomarcadores como adutos de DNA, aberrações cromossômicas, MN e danos oxidativos (Valverde e Rojas, 2009).

As principais vantagens desse ensaio incluem a aplicação relativamente fácil a qualquer tecido de interesse, a detecção de múltiplas classes de danos ao DNA, geração de dados a nível celular, sensibilidade para detectar baixos níveis de danos ao DNA, requerimento de pequenos números de células por amostra, flexibilidade, rapidez e capacidade de execução com quantidades reduzidas de amostra (Hartmann et al., 2003; Tice et al., 2000).

1.6.3. Teste do MN

Micronúcleos (MN) são massas de cromatina com aparência e estrutura de pequenos núcleos localizados no citoplasma que se originam de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos nos núcleos principais durante a divisão nuclear (Heddle et al., 1991). A formação de MN em células em divisão é o resultado da quebra de cromossomas devido a lesões de DNA não reparadas ou mal reparadas, ou erros na segregação de cromossomos devido ao mau funcionamento do fuso mitótico (Bonassi et al., 2007). Agentes clastogênicos causam quebras no DNA, enquanto os aneugênicos provocam perdas de cromossomos inteiros.

A frequência de MN vem sendo analisada em ensaios *in vivo* ou em células cultivadas de muitos tecidos e organismos, desde plantas a humanos, sendo que a maioria dos trabalhos tem empregado eritrócitos de mamíferos e linfócitos humanos (Heddle et al., 2011). No presente estudo este biomarcador foi utilizado em culturas de células de pulmão de hamster chinês (V79) expostos a amostras de material particulado atmosférico para avaliar sua genotoxicidade. Também foi empregado em amostras de sangue periférico e mucosa oral de crianças para biomonitoramento humano, através dos ensaios CBMN-cyt e BMCyt, respectivamente.

O teste de micronúcleo *in vitro* tornou-se um ensaio quantitativo mais robusto de danos cromossômicos pelo desenvolvimento da técnica de bloqueio de citocinese que introduziu a substância Citocalasina-B durante o cultivo celular, a qual impede a clivagem do citoplasma após a divisão nuclear, produzindo células binucleadas (Fenech e Morley, 1985). Este procedimento eliminou os fatores de confusão na expressão de MN pelos efeitos citostáticos causados por más condições de cultura, efeitos do tratamento, e variabilidade na resposta mitogênica em linfócitos. No ensaio de micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN), a contagem de MN é discriminada em células que passaram por uma divisão celular, reconhecidas pela sua aparência binucleada, e em células mononucleadas, que não se dividiram durante o período de cultura *in vitro* (Kirsch-Volders et al., 2011).

O ensaio de CBMN evoluiu para um método mais abrangente para medir quebras e perdas cromossômicas, erros de reparo, não disjunção, necrose, apoptose e citostase. Este método também é usado para medir pontes nucleoplásmicas (NPBs), um biomarcador de cromossomos dicêntricos resultantes de fusões teloméricas ou erros de reparo, e para medir brotos nucleares (NBUDs), biomarcador de amplificação gênica. O conceito de "citoma" implica que cada célula no sistema estudado é avaliada citologicamente pelo seu estado de viabilidade (necrose, apoptose), seu estado mitótico (mononucleada, binucleada, multinucleada) e seu dano cromossômico ou estado de instabilidade (presença de MN, NPBs, NBUDs). Por estas razões foi proposto referir-se a esta técnica como o ensaio CBMN citoma – "CBMN-Cyt" (Fenech, 2006 e 2007).

De forma similar ao CBMN-cyt, foi proposto que a análise de MN em células da mucosa oral englobasse a avaliação de anomalias nucleares (Tolbert et al., 1992) resultando em um protocolo de abordagem de citoma, o Ensaio do MN em mucosa oral – citoma, BMCyt

(Thomas et al., 2009). Além dos biomarcadores de danos genéticos (MN e NBUDs) e defeitos na citocinese (binucleadas), o ensaio registra a ocorrência do potencial proliferativo (células basais) e de morte celular (cromatina condensada, picnose, cariorréxis e cariólise), conforme mostrado na Figura 7. Sua abordagem minimamente invasiva tem facilitado sua crescente aplicação em estudos epidemiológicos moleculares para investigar o impacto da nutrição, fatores de estilo de vida e exposição à genotoxinas ocupacionais e ambientais (Thomas et al., 2009).

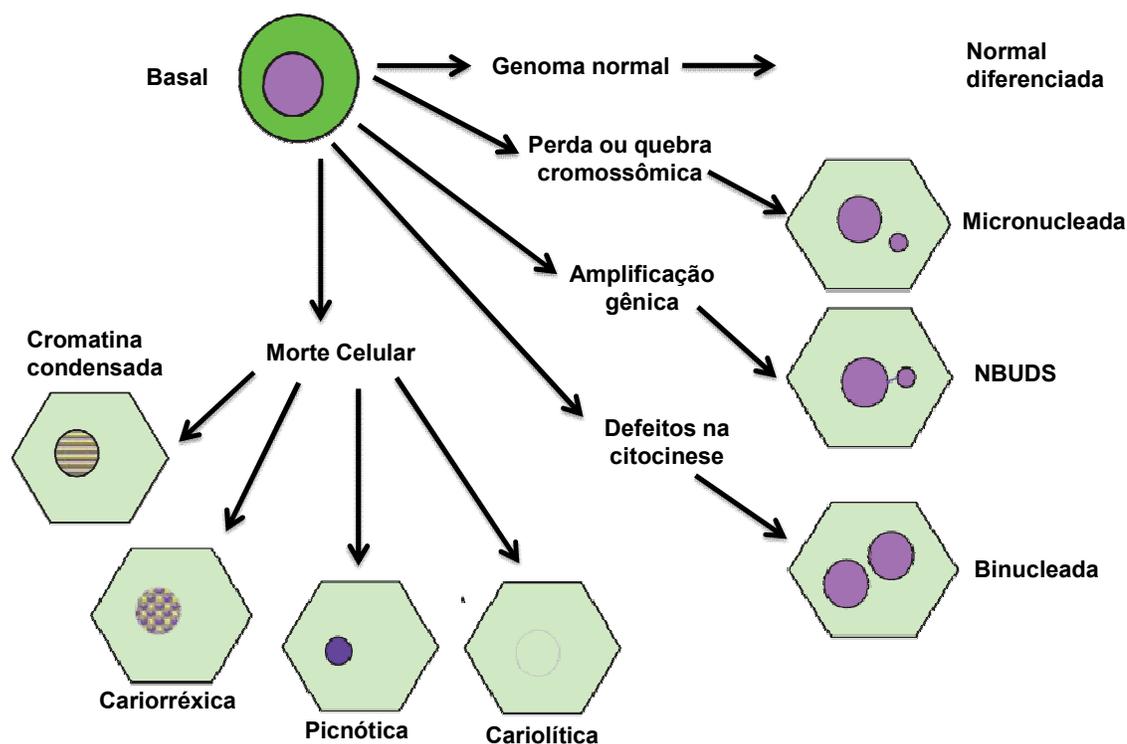


Figura 7 – Tipos celulares avaliados pelo Ensaio do MN em Mucosa Oral – Citoma, BMCyt. Adaptado de Thomas et al. (2009).

As células bucais são a primeira barreira das rotas de exposição via inalação ou ingestão, sendo capazes de metabolizar carcinógenos a seus produtos reativos. Assim estas representam um alvo preferencial para eventos genotóxicos iniciais induzidos por agentes cancerígenos que entram no corpo por inalação e ingestão (Holland et al., 2008). Já as células sanguíneas representam uma matriz importante para a maioria dos agentes químicos devido ao plasma estar em contato com todos os tecidos do corpo, assim, seu estado celular, nuclear e metabólico pode refletir a extensão geral da exposição corporal (Valverde e Rojas, 2009; Yusa et al., 2015).

1.7. Área de estudo

O município de Triunfo, localizado no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (29°56'36"S e 51°43'05"O), possui uma população aproximada de 27.638 habitantes em 818,799 km² de superfície (IBGE, 2015), e um importante complexo industrial petroquímico de 3.600 hectares.

O setor petroquímico transforma derivados do petróleo, especialmente nafta e gás natural, em bens de consumo e em insumos industriais. Esse setor pode ser dividido em três gerações, cada uma corresponde a uma determinada fase de transformação de matérias primas ou insumos petroquímicos. A fase de refino do petróleo bruto, realizada pelas refinarias de petróleo, é anterior a esse processo, fornecendo a matéria bruta da cadeia petroquímica. No Brasil, a nafta é a principal matéria-bruta utilizada (Gomes et al., 2005).

As empresas de primeira geração, chamadas centrais de matérias-primas, processam o nafta ou gás natural de maneira a obter produtos petroquímicos básicos, como o eteno, o propeno e aromáticos. As empresas de segunda geração são as produtoras de intermediários e resinas termoplásticas, como o poliestireno, polietilenos, o polipropileno e os elastômeros. Estes produtos são fornecidos às empresas de terceira geração, mais conhecidas por empresas de transformação plástica, que os transformam em produtos finais como embalagens plásticas, utilidades domésticas, brinquedos, calçados, pneus, entre outros (Gomes et al., 2005).

No Brasil, os principais pólos petroquímicos, integrados às centrais de matérias-primas estão localizados em São Paulo (Pólo de Capuava), Bahia (Pólo de Camaçari), Rio Grande do Sul (Pólo de Triunfo) e Rio de Janeiro (Pólo de Duque de Caxias). O Pólo petroquímico de Triunfo foi o terceiro a ser construído, na década de 70. A sua central de matérias-primas - Copesul (atual Braskem) - começou a operar em 1982. Atualmente, este pólo tem capacidade produtiva de 1.452 mil toneladas de eteno (Braskem, 2016). Sua área industrial é composta por seis empresas de petroquímica primária e secundária. O centro de matérias-primas industriais também produz benzeno, tolueno, xileno, propano, butadieno, MTBE e butano-1.

Estudos prévios na mesma área do distrito petroquímico utilizaram o ensaio *Salmonella* /microsoma para investigar o efeito mutagênico das partículas suspensas totais - PTS (Vargas, 2003). Os resultados mostraram que um local dentro do complexo industrial, localizado em uma área onde ocorre maior deposição de partículas, apresenta os maiores

níveis de atividade mutagênica ($18,17 \text{ rev} / \text{m}^3$). Outros dois locais na área ambiental, fora da planta industrial (7 e 9 km do complexo petroquímico), apresentaram 83 e 89% de mutagenicidade ($3,17$; $2,02 \text{ rev} / \text{m}^3$, respectivamente).

Os pontos de amostragem do presente estudo possuem característica mista rural, urbana e industrial. Dois locais foram posicionados na área de deposição máxima de $\text{MP}_{2,5}$ a partir da principal fonte emissora petroquímica, a 2,5Km de distância da mesma, conforme um estudo de modelagem de dispersão de poluentes (ISC_ST3, *Software* ISC-AERMOD View 5.8.0, Lakes Environment). Estes locais, NO e NE, estão situados na primeira e segunda direção preferencial dos ventos na região, respectivamente. Os nomes dos locais de amostragem fazem referência a sua orientação em relação à fonte emissora, NO- Noroeste e NE- Nordeste. Um terceiro local (NO II) foi escolhido como referência em área caracterizada com menor incidência de casos de câncer no município (Fepam, 2010). Este local também está posicionado na primeira direção preferencial dos ventos, distante 35Km da fonte emissora (Figura 8).

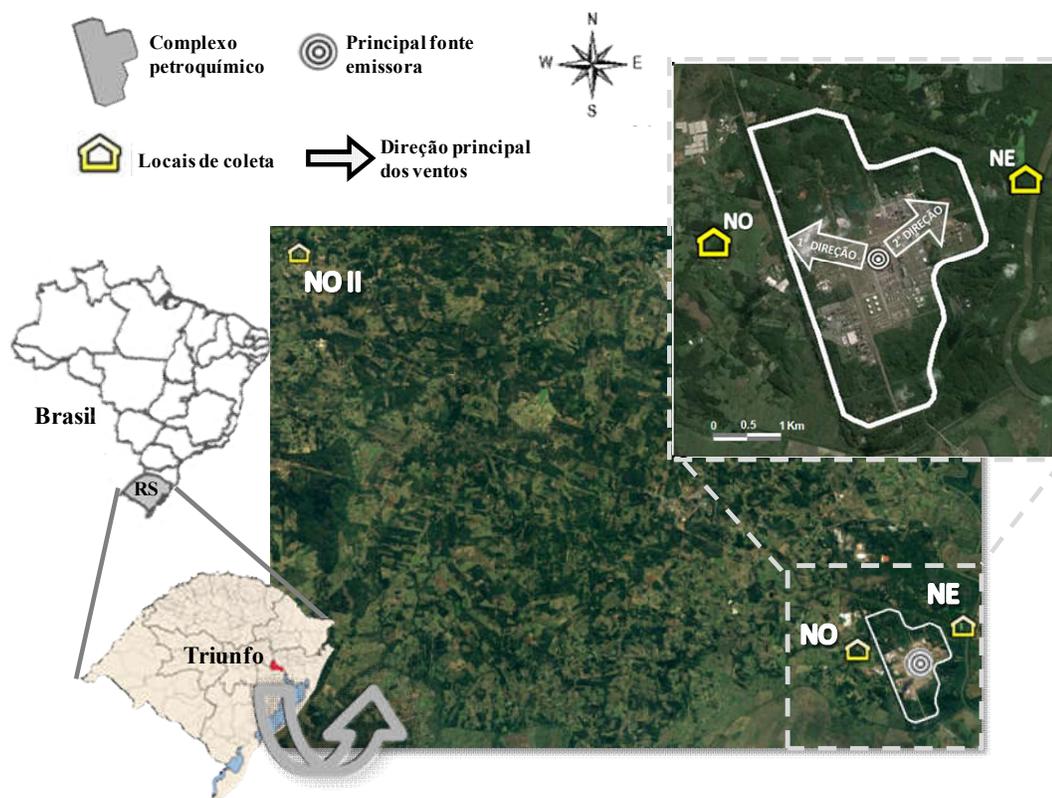


Figura 8 – Área de estudo localizada no município de Triunfo/RS.

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos biológicos associados à dispersão de material particulado atmosférico inalável em área sob influência de um complexo petroquímico, integrando os resultados de biomonitoramento ambiental e humano através de biomarcadores de genotoxicidade.

Os objetivos específicos buscaram:

- Investigar a genotoxicidade de material particulado atmosférico inalável em linhagens celulares de *Salmonella tiphymurium* e de pulmão de hamster chinês (V79) como marcadores de exposição ambiental, em diferentes estações do ano;
- Avaliar a sensibilidade de diferentes biomarcadores de genotoxicidade aos contaminantes orgânicos presente nas partículas atmosféricas.
- Realizar biomonitoramento em crianças para medir danos no DNA provocados pela exposição aos contaminantes mutagênicos ambientais através dos ensaios cometa e do micronúcleo em sangue periférico e análise de micronúcleos em células da mucosa oral;
- Avaliar a sensibilidade de biomarcadores genéticos em crianças para estimar exposição humana a poluentes ambientais;

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Considerando os objetivos propostos, a presente tese permitiu a elaboração de dois capítulos correspondentes aos artigos científicos resultantes do projeto desenvolvido.

O primeiro artigo “*Genotoxicity biomarkers for airborne particulate matter (PM2.5) in an area under petrochemical influence*”, publicado na revista *Chemosphere*, apresenta a avaliação dos efeitos associados ao material particulado atmosférico inalável fino em área sob influência industrial petroquímica, através de três biomarcadores de genotoxicidade. A avaliação ambiental integrando diferentes biomarcadores amplia a possibilidade de detecção de danos dos poluentes e permite investigar suas sensibilidades.

O segundo artigo “*Estudo integrado de biomarcadores de genotoxicidade em partículas inaláveis e escolares de áreas com influência petroquímica*”, a ser submetido à revista *Environment International*, empregou biomarcadores de genotoxicidade em sangue periférico e em mucosa oral de escolares de duas áreas localizadas na primeira direção dos ventos, a partir de um complexo industrial petroquímico, associado à caracterização do potencial mutagênico (Ensaio *Salmonella*/microssoma) das partículas inaláveis desses locais.

**3.1. CAPÍTULO 1 - “GENOTOXICITY BIOMARKERS FOR AIRBORNE PARTICULATE
MATTER (PM2.5) IN AN AREA UNDER PETROCHEMICAL INFLUENCE”**

Artigo publicado na revista Chemosphere



Genotoxicity biomarkers for airborne particulate matter (PM_{2.5}) in an area under petrochemical influence



Andréia Torres Lemos^{a, b}, Clarice Torres de Lemos^a, Andressa Negreiros Flores^a,
Eduarda Ozório Pantoja^a, Jocelita Aparecida Vaz Rocha^a, Vera Maria Ferrão Vargas^{a, b, *}

^a Departamento de Pesquisas e Análises Laboratoriais, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM), Rua Aurélio Porto, 37, 90620-090 - Partenon, Porto Alegre, RS, Brazil

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

HIGHLIGHTS

- PM_{2.5} was genotoxic in the *Salmonella* assay, Comet Assay and Micronuclei Test.
- PM_{2.5} was lower than quality standards but genotoxicity were detected in all samples.
- Nitroarenes and aromatic amines had high influence in the mutagenic response.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 April 2016
Received in revised form
22 May 2016
Accepted 30 May 2016
Available online 22 June 2016

Handling Editor: A. Gies

Keywords:

Ames test
Comet assay
Micronucleus
Nitroarenes
Aromatic amines
V79 cells

ABSTRACT

The effects of fine inhalable particles (PM_{2.5}) were evaluated in an area under the influence of a petrochemical industry, investigating the sensitivity of different genotoxicity biomarkers. Organic extracts were obtained from PM_{2.5} samples at two sites, positioned in the first and second preferential wind direction in the area. The extracts were evaluated with *Salmonella*/microsome assay, micro-suspension method, strains TA98, YG1021 and YG1024. The mammalian metabolization fraction (S9) was used to evaluate metabolite mutagenicity. The Comet Assay (CA) and Micronuclei Test were used in a Chinese hamster lung cell line (V79). All extracts showed mutagenicity in *Salmonella*, and nitrogenated compounds were strongly present. Genotoxicity were found in CA in almost all extracts and the micronuclei induction at the Site in the first (Autumn 1, Winter 1), and in the second (Spring 2) wind direction. V79 showed cytotoxicity in all samples. The three biomarkers were concordant in characterization Site NO with worse quality, compatible with the greater pollutants dispersion in the first wind direction. All PM_{2.5} concentrations were lower than those recommended by air quality standards but genotoxic effects were detected in all samples, corroborating that these standards are inadequate as quality indicators. The *Salmonella*/microsome assay proved sensitive to PM_{2.5} mutagenicity, with an outstanding influence of nitroarenes and aromatic amines. Analyses using CA and the micronucleus test broadened the levels of response that involve different damage induction mechanisms. Results show that the complex PM_{2.5} composition can provoke various genotoxic effects and the use of different bioassays is essential to understand its effects.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Airborne particulate matter (PM) consists of a mixture with a wide variety of organic and inorganic substances, in solid or liquid

state, which is found in suspension in the atmosphere (WHO, 2006). The composition of these particles may vary substantially, including different classes of chemical substances, such as heavy and transition metals, hydrocarbons, ions and microorganisms (Fajersztajn et al., 2013). Particles up to 2.5 μm in aerodynamic diameter (PM_{2.5}), known as fine and inhalable, are a risk to health due to the capacity of penetrating and depositing in the airways (Vargas, 2003). Studies by the International Agency for Research on

* Corresponding author.

E-mail address: vera.vargas@pq.cnpq.br (V.M.F. Vargas).

Cancer have warned that airborne pollution should be considered carcinogenic to man (IARC, 2015). Also, the World Health Organization (WHO) calls attention to the need to establish new limits that are safer for human health (WHO, 2013).

In the air there are several classes of chemical compounds associated with adverse effects whose levels are not routinely measured. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of substances composed of carbon and hydrogen that contain two or more condensed aromatic rings (IARC, 2010). PAHs are contaminants widely distributed throughout the environment and are emitted when there is incomplete burning of organic matter, both of natural and anthropogenic origin. When present in the atmosphere, PAHs may be in the gaseous phase or associated with particulate matter according to their vapor-pressure and the atmospheric conditions. In general, low molecular weight species remain in the gas phase, while heavier HPAs tend to bind to PM (Mesquita et al., 2014). They are a global problem, since they are transported long distances by air and present mutagenic and carcinogenic characteristics (Meire et al., 2007). Their nitrated derivatives (nitro-PAHs) also occur widely, and are emitted directly or produced in the air by interaction between PAHs and nitrogen oxides (NOx). Some nitro-PAHs have a higher toxic potential than the original compounds (Mesquita et al., 2014).

The petrochemical industry emits a large variety of pollutants, such as volatile organic compounds, PAHs, polychlorinated biphenyls (PCBs), metals, sulfur compounds and nitrogen oxides (Bahadori, 2014; Chan et al., 2006; Nadal et al., 2009). Different *in vitro* and *in vivo* bioassays detected genotoxic effects caused by samples of surface water, airborne particulate matter, sediments and effluents collected in petrochemical area (FEPAM, 2008).

Early detection of exposure to pollutants can significantly diminish the occurrence of effects adverse to environmental health. Therefore, biomarkers that are sensitive to detect toxic substances in genetic material are important tools to adopt measures to prevent damage caused by environmental pollution (Park and Choi, 2007; Van der Oost et al., 2003; Zapata et al., 2016).

The *Salmonella*/microsome assay has been efficiently used to investigate the mutagenic potential of airborne particulate matter and has been the most widely used method for this purpose (Claxton and Woodall, 2007). Using different strains and protocols it is possible to characterize the classes of compounds responsible for the mutagenicity of the sample studies (Claxton et al., 2010).

Other levels of biological organization are useful to evaluate particulate matter genotoxicity. The V79 cell line of Chinese hamster lung cells is known for its sensitivity to genotoxic agents present in environmental samples and have been used to detect damage by the comet assay and micronucleus test (Brito et al., 2013; Lemos et al., 2011; Nunes et al., 2011). This cell culture is among the *in vitro* biological systems recommended in international protocols (OECD, 2010).

The Comet Assay have different protocols to detect simple or double strand DNA breaks, lesions at alkali-labile sites and incomplete repair of the excision sites, oxidative damage and crosslinks, in different eukaryotic cell types (Collins et al., 2008; Hartmann et al., 2001; Speit and Hartmann, 1999). The micronucleus test (MN) is an efficient cytogenetic method supplying a reliable index of chromosomal break (clastogenic agents) or loss (aneugenic agents) (Fenech, 2000; Fenech and Bonassi, 2011). These assays are being widely used to investigate environmental samples and have proved useful for the assessment of airborne particulate matter (Brito et al., 2013; Ianisteki et al., 2009; Lepers et al., 2014).

Hence, the objective of the present study was to evaluate the genotoxic effects associated with the fine inhalable particles in an area under the influence of the petrochemical industry,

investigating different genotoxicity biomarkers.

2. Material and methods

2.1. Area of study

The city of Triunfo is located in the south of Brazil (29°56'36''S and 51°43'05''O) with approximately 27,638 inhabitants in an area of 818.799 km² (IBGE, 2015). The particulate matter samples were collected in an area with mixed rural, urban and industrial characteristics, which is under the influence of a petrochemical complex (3600 ha). The industrial area consists of six companies of primary and secondary petrochemicals, producing 1252 tons of ethane annually. The center of industrial raw materials also produces benzene, toluene, xylene, propane, butadiene, MTBE and butane-1. Previous studies in the same petrochemical district area used the *Salmonella*/microsome assay to investigate the mutagenic effect of total suspended particles – TSP (Vargas, 2003). The results showed that a site inside the industrial complex, located in an area where most particulate deposition occurs, presented the highest levels of mutagenic activity (18.17 rev/m³) measured. Two other locations in the environmental area outside the industrial plant (7 and 9 km from the petrochemical complex), presented 83 and 89% decrease in mutagenicity (3.17; 2.02 rev/m³).

Two sampling sites were selected in the area with maximum deposition of PM_{2.5} from the main source of emission of the petrochemical complex. These areas were determined based on the result for pollutant dispersion model ISC_ST3 (Software ISC-AERMOD View 5.8.0, Lakes Environment). Sites NO and NE were positioned in the first and second preferential direction of the winds in the region. Both sites are located 2.5 Km away from the main source of emission in the center of industrial raw materials. The sampling sites are named according to their orientation towards the source of emission, NO-Northwest and NE –Northeast (Fig. 1).

2.2. Collection of airborne particulate matter

Samples of fine inhalable particles (PM_{2.5}) were collected using Teflon membrane filters (TX40HI20WVW, 254 × 203 mm) in large volume air samplers (AGV MP2.5 1200/CCV Thermo Environmental Instruments), operated at a flow rate of 1.3–1.5 m³/min per 24 h periods. The collections were performed from February/2013 to March/2014, with a weekly frequency, whenever possible, with a total of 42 samplings. Calibrations and maintenance were done in these samplers according to the manufacturer's instructions (Energética, 2012), in order to have a good quality control of the data. Before and after the samplings, the filters were weighed and stabilized (45% humidity) to determine the PM_{2.5} concentration expressed in units of µg/m³ of sampled air (ABNT, 1997). The filters were kept protected from light at –20 °C, until the extraction procedures were performed.

2.3. Organic extraction

The filters collected were grouped into two samples per season (Table 1). One fourth of each filter was submitted to extraction of the organic compounds using the ultrasound technique with dichloromethane solvent (DCM, CASRN. 75-09-2), as described in Vargas et al. (1998). The extractable organic matter (EOM) was determined by weighing on analytical balance SARTORIUS (0.000001 g) 1000 µl aliquots of the extracts which were taken to dryness. The total mass obtained in the extract was divided by the volume of air sampled (EOM in µg/m³).

Before the bioassays, the organic extracts were dried with

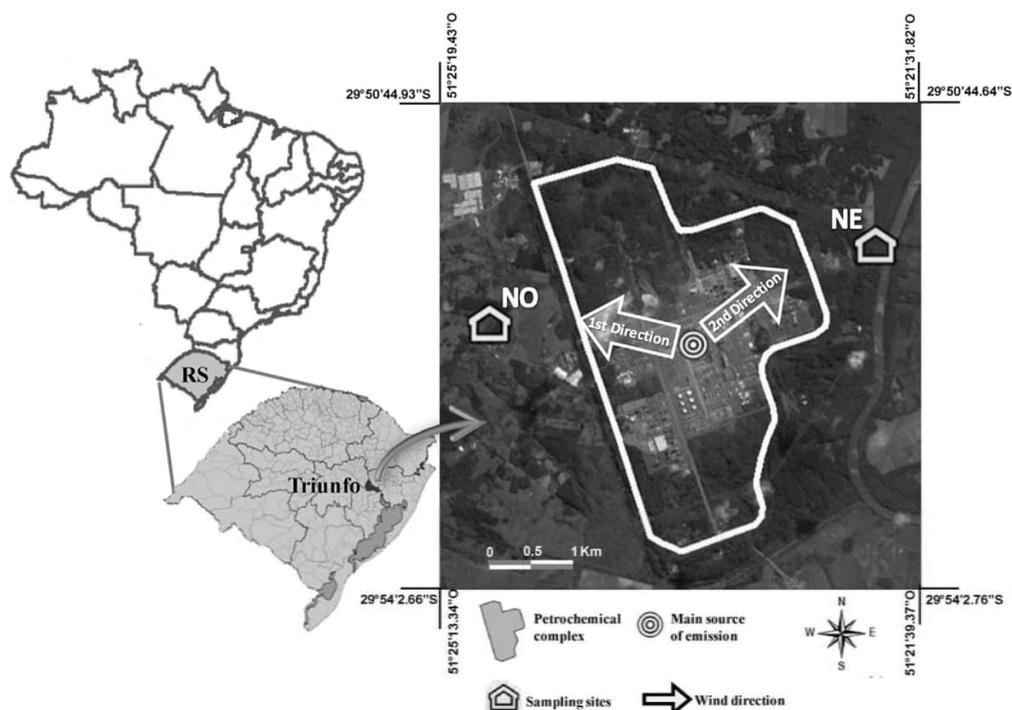


Fig. 1. Area of study in the city of Triunfo/RS/Brazil.

gaseous nitrogen and resuspended in dimethyl sulfoxide (DMSO, CASRN. 67-68-5).

2.4. *Salmonella/microsome assay*

The mutagenicity of the organic extracts was evaluated by *Salmonella/microsome assay* (Maron and Ames, 1983), micro-suspension method (Kado et al., 1983). The TA98 strain which detects DNA frameshift error, was used in the absence (-S9) and presence (+S9) of an *in vitro* metabolic fraction, prepared from male *Sprague-Dawley* rat liver (induced by Aroclor 1254, Moltex S.A., USA). The effect of nitro derivative mutagenic compounds was investigated through strains derived from TA98, which present a high activity of nitroreductase (YG1021) and O-acetyltransferase (YG1024) enzymes, conferring greater sensitivity on nitroarenes and dinitroarenes/aromatic amines, respectively (Watanabe et al., 1989, 1990). Six sample concentrations were tested (1.25; 2.50; 10.00; 20.00 and 40.00 $\mu\text{g}/\text{plate}$), in duplicates, in the presence of negative controls (5 μl Dimethylsulfoxide –DMSO solvent and 100 μl liquid nutrient medium) and positive controls (4-nitroquinoline oxide- 4NQO, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$, CASRN. 56-57-5; 2-nitrofluorene – 2NF, 0.15 $\mu\text{g}/\text{plate}$, CASRN. 607-57-8; and 2-aminofluorene – 2AF, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$, CASRN. 153-78-6 of Sigma Chemical Company, St. Louis, MO).

The samples were considered mutagenic when they presented a significant ANOVA ($P \leq 0.05$) between the dosages and a positive dose-response curve ($P \leq 0.05$). The response was considered indicative when significance was observed only in the dose-response. The curves were analyzed in their linear portion using linear regression or Bernstein models (Bernstein et al., 1982), Salanal software (*Salmonella Assay Analysis*, version 1.0, Research Triangle Institute, RTP, NC, USA). The mutagenic potential of the

positive and indicative samples was estimated by the inclination of the regression curve and expressed in number of revertants per μg of extract ($\text{rev}/\mu\text{g}$) and revertants per cubic meter of air sampled ($\text{rev}/\text{m}^3 = \text{rev}/\mu\text{g} \times \text{EOM}$).

The cytotoxicity of the samples was evaluated by cell survival in strain TA98, in tests parallel to those of mutagenesis. The suspension obtained after the incubation stage at 37 °C for 90 min (bacterial culture $1-2 \times 10^{10}$ cells/mL + S9 mix or phosphate buffer 0.1 M + solvent or sample) was diluted in phosphate buffer (pH = 7.4) until the concentration of $1-2 \times 10^2$ cells. The diluted bacterial culture was streaked onto the surface of nutrient agar and incubated for 72 h at 37 °C. After this period, the surviving colonies were read manually. The samples were considered cytotoxic when they presented a low growth compared to the negative control with values below 60% (Vargas et al., 1993).

2.5. *Micronucleus test in V79 cell line*

The genotoxicity of the organic extracts established by this biomarker was performed in cultures of the V79 cell line. Aliquots of cell suspension containing 5×10^4 cells were cultivated for 24 h before the samples were exposed, in 25 cm^2 culture flasks, containing MEM medium supplemented with fetal bovine serum, penicillin G, streptomycin, L-glutamine and sodium bicarbonate. These cells were exposed to the organic extracts at concentrations of 10 and/or 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, for 3 h. After exposure, the cultures were kept for another 21 h in the presence of cytochalasin B. The flasks were for an incubator at 37 °C, in the presence of 5% of CO₂, in all phases of the experiment. The negative controls used were sterile distilled water and DMSO 1%, and the positive control was bleomycin (Blenoxane, Bristol, 0.1 mg/mL). The assays were performed in duplicate. After the period of exposure, the cultures were washed

Table 1Data on the filters containing PM_{2.5} collected in an area under the influence of the petrochemical industry.

Sample	Sampling dates	Site NE			Site NO		
		C	Mean C	EOM	C	Mean C	EOM
		($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Summer 1	Feb 15th, 21th, 27th, 2013 Mar 05th, 11th, 17th, 2013	5.91–5.33 – 4.6–5.26 – 9.44–3.71	5.71 ± 1.98	0.85	6.52–5.28 – 9.1–8.18 – 5.53–4.42	6.50 ± 1.81	0.68
Autumn 1	Mar 23th, 29th, 2013 Apr 28th, 2013 May 04th, 10th, 2013	21.87–6.75 – 17.95–4.73 – 16.97	13.65 ± 7.49	1.24	12.62–7.59 – 20.38–5.5 – 21.46	13.51 ± 7.25	1.10
Autumn 2	May 16th, 22th, 28th, 2013 June 03th, 09th, 15th, 2013	4.04–5.27 – 18.11–6.73 – 17.15 –7.09	9.73 ± 6.22	1.45	6.67–4.96 – 5.88–8.1 – 17.55–14.48	9.61 ± 5.16	1.46
Winter 1	June 28th, 2013 July 09th, 15th, 21th, 27th, 2013 Aug 02th, 2013	7.1–8.89 – 3.82–3.83 – 11.36–16.67	8.61 ± 4.91	1.07	9.03–8.52 – 2.9–3.4 – 11.49	7.07 ± 3.75	1.25
Winter 2	Aug 08th, 14th, 20th, 2013 Sept 07th, 19th, 2013	12.06–4.45 – 12.23–13.97 – 8.8	10.30 ± 3.77	1.07	13.56–3.75 – 14.04–11.31	10.66 ± 4.76	1.39
Spring 1	Sept 25th, 2013 Oct 01th, 7th, 13th, 25th, 2013	3.41–9.11 – NC – 7.77–10.6	7.72 ± 3.10	0.74	3.53–8.34 – 8.52–5.7 – 7.77	6.33 ± 2.19	0.72
Spring 2	Nov 24th, 30th, 2013 Dec 06th, 12th, 18th, 24th, 2013	10.23–11.97 – 8.93–9.88 – 9.95 –4.42	9.23 ± 2.56	2.38	10.79–15.03 – 10.67–11.21 – 12.12 –5.1	10.82 ± 3.23	0.75
Summer 2	Feb 10th, 2014 Mar 06th, 18th, 2014	10.24–5.34 – 1.77	5.78 ± 4.25	1.11	9.75–9.49 – 5.95	8.40 ± 2.12	1.52

Site NO and NE were positioned in the first and second preferential direction of the winds in the region; C = concentration of fine inhalable particles in the filter; EOM = Extracted organic matter; NC = filter not collected.

in saline phosphate buffer (SPB) and the cells collected with trypsin (0.15%), centrifuged for 5 min and resuspended in sodium citrate and formaldehyde 0.4%. The material was fixed in methanol: glacial acetic acid 3:1 and the slides were stained with Giemsa 2% (Fenech, 1993).

For the micronuclei (MN) test, 2000 cells were analyzed per sample and controls using the criteria of Fenech (1993). The statistical analysis was performed by the Z test which compares two Poisson curves. The result was considered positive if a significant difference was observed in relation to the negative control, at least $P < 0.05$ (Zar, 1996).

The nucleation index (NI) was used to evaluate cytotoxicity, calculated by equation: $\text{NI} = 1 \times \text{mononucleated cells} + 2 \times \text{binucleated} + 3 \times \text{polynucleated}/1000$ cells. Three counts per sample were used and statistically evaluated by one-way ANOVA, Dunnett's. The samples were considered cytotoxic if they were smaller than the negative control at $P \leq 0.05$.

2.6. Comet assay in V79 cell line

The alkaline version of the Comet Assay was performed according to Tice et al. (2000). The cell suspension containing 1×10^6 cells of the V79 line was exposed for 3 h to the organic extracts of PM_{2.5}, at the concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (resuspended in 10 μL DMSO). The assays were performed in duplicate using negative (DMSO 1%) and positive controls (200 μM de H_2O_2). The slides were stained with 50 μL of ethidium bromide (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and evaluated under a fluorescence microscope. The analysis of 100 cells was performed to calculate tail intensity, using IV Comet Assay software (Perceptive Instruments, Suffolk, UK). The sites sampled were compared to the negative control by analysis of variance (ANOVA), Dunnett test, in a GraphPad Prism program, version 5.0.

3. Results

The volume of air that passed through each filter varied from 832.03 to 2022.37 m^3 , with mean values of 1630.79 ± 107.09 m^3 . The PM_{2.5} concentrations ranged from 1.77 to 21.87 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, with

similar values at both sites (Table 1). No filter surpassed the maximum particle concentration (25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) recommended by the World Health Organization (WHO) for 24-h samplings (WHO, 2006). The annual means of PM_{2.5} observed (Site NE: 8.97 ± 4.84 and Site NO: 9.17 ± 4.53) were close to the limit of 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ also proposed by WHO.

The results of the *Salmonella*/microsome assay for frameshift error of the organic extracts of PM_{2.5} showed the presence of mutagenic compounds in all samples evaluated (Fig. 2). The mutagenic potential ranged from 0.45 ± 0.22 to 18.07 ± 1.25 rev/m^3 at site NE, and from 0.70 ± 0.09 to 18.16 ± 1.54 rev/m^3 at site NO. The addition of the liver metabolization system *in vitro* (S9mix) led to decreased mutagenesis in most samples.

The responses of the Autumn-Winter periods were significantly higher than those observed during Spring-Summer at site NE. This, however, was not observed at site NO. The highest results were observed in the period corresponding to Autumn 1. The results in revertants/ m^3 of air sampled for all strains used are showed in Table A1.

Table 2 shows the mutagenicity of the organic extract for all strains studied, in revertants/ μg . A higher mutagenic potential was observed at site NO in 55% of the assays performed (Summer 1 – all strains; Autumn 1 –TA98 + S9, YG1021, YG1024 and YG1024 + S9; Autumn 2 – YG1021 and YG1024 + S9; Winter 1- TA98, YG1021, YG1024 and YG1024 + S9; Winter 2- YG1024; Spring 1- TA98; Spring 2- TA98, TA98 + S9, YG1021 and YG1024 + S9; Summer 2- YG1024 + S9), with only 10% of the responses higher at site NE (Autumn 2 – TA98 + S9; Winter 1- TA98 + S9; Winter 2- YG1024 + S9; Spring 1- YG1024 + S9). The responses were similar at both sites in 35% of the tests.

The use of strains from the YG family allowed identifying the presence of nitrogenated compounds in almost all samples of particulate matter. The highest responses occurred in strain YG1024 indicating the predominance of dinitroarenes in the samples. These responses reached values of up to 1048.23 ± 90.28 $\text{rev}/\mu\text{g}$ (Winter 1 – Site NO) indicating a high mutagenic potential. The presence of mononitroarenes was detected at a lower frequency and intensity through the YG1021 strain, with a peak of intensity of 432.84 ± 28.80 $\text{rev}/\mu\text{g}$, also in Winter 1 – Site NO.

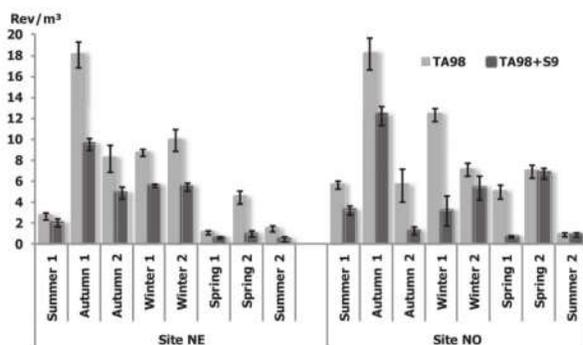


Fig. 2. Mutagenicity in revertants/m³ of organic extracts of PM_{2.5} from areas under the influence of the petrochemical industry positioned in the first (Site NO) and second (Site NE) preferential direction of the winds.

Negative controls (DMSO): 37.44 ± 15.28 (TA98); 37.66 ± 13.60 (TA98 + S9). Positive controls: 4NQO (TA98) 226.31 ± 104.25; 2AF (TA98 + S9) 186.75 ± 104.76.

As to the mutagenesis observed in the parental strain (TA98) there was an increment of up to 1.5 times in the response for YG1021 and 8.2 times for YG1024 at Site NE. At Site NO these values were 43.8 times greater for YG1021 and 106 times greater for YG1024.

Adding the *in vitro* metabolism system to strain YG1024 showed the occurrence of aromatic amines at both places, with an increment of up to 144.30 times of the mutagenic response compared to TA98 + S9.

The total sum of the mutagenic potencies found in all strains evaluated for each sample (Table 2) was greater in the period of Autumn 1, Site NE and Winter 1, Site NO.

The cell survival results in the *Salmonella*/microsome assay are also presented in Table 2. Most of the results obtained normal cell survival (>60%), and cytotoxicity was detected in 6 samples, always at Site NO. Cell survival dropped to values of 24% in the toxic samples. Site NE did not present toxic responses.

Table 3 shows the Comet assay results in V79 cells for the organic extracts of PM_{2.5}. Genotoxic responses were found in

almost all samples for the tail intensity parameter, which represents the percentage of DNA in the nucleotide tail. Only the samples for the Spring 2 period, at both sites, did not present statistically significant damage. Considering all samples analyzed from each site, the mean damage was greater at the site referring to the first direction of the winds (Site NO), where the highest tail intensity value was found (44.09 ± 29.37).

Sample cytotoxicity in V79 cells was evaluated by the nucleation index (Table 3). This showed toxic responses for the concentration of 10 µg/mL, in 50% of the samples at Site NO (Winter 2, Spring 1 and 2 and Summer 2) and 75% of the samples from Site NE (Autumn 2, Winter 1 and 2, Spring 2, Summer 1 and 2). The seven samples that presented an NI higher than 1.3 at the first concentration tested were also evaluated in 20 µg/mL resulting in toxic responses, three at Site NE and four at Site NO.

Micronuclei induction (Table 3) was significant in the V79 cells exposed to the concentration of 10 µg/mL of the organic extracts at Site NO, collected in Autumn 1 and Winter 1. Among the samples also evaluated in 20 µg/mL, only Spring 2, Site NE, presented a positive response.

4. Discussion

To protect public and environmental health, air quality standards were created and have been a major component of the management of risks and environmental policies. However, there is no evidence to support the existence of a safe level or limit of exposure (Kim et al., 2015), leading the International Agency for Research on Cancer (IARC, 2015) to classify MP as carcinogenic to humans (Group 1). In the present study, all the samples of PM_{2.5} collected presented concentrations lower than those recommended in the WHO guidelines (WHO, 2006), both in 24 h samplings and in annual means. However, all samples presented a cytotoxic, mutagenic and/or genotoxic effect, corroborating the inadequacy of these standards established as quality indicator.

According to Lippmann (2012), the current regulations, limited to the mass concentration of coarse (PM₁₀) and fine inhalable particulates (PM_{2.5}) are inefficient tools to protect public and environmental health against the adverse effects of particulate pollution. It would be more appropriate to focus on policies that

Table 2

Mutagenicity and cell survival of organic extracts of fine inhalable particles in areas under the influence of a petrochemical industry.

Sample	TA98	TA98 + S9	YG1021	YG1024	YG1024 + S9	Survival (%)		
						-S9	+S9	
Site NE	Summer 1	3.1 ± 0.38	2.33 ± 0.45	2.62 ± 0.34	6.12 ± 1.06	3.67 ± 0.25	69	100
	Autumn 1	14.57 ± 1.01	7.66 ± 0.46 ^b	17.00 ± 1.09	72.64 ± 7.78	28.19 ± 1.61 ^b	93	83
	Autumn 2	5.62 ± 0.87 ^b	3.34 ± 0.37	5.30 ± 0.62 ^b	31.05 ± 4.00 ^b	11.47 ± 1.55	100	94
	Winter 1	8.12 ± 0.35 ^b	5.19 ± 0.17	7.98 ± 0.98	8.87 ± 1.80	12.43 ± 0.64	100	80
	Winter 2	9.24 ± 1.00	5.06 ± 0.39	6.40 ± 0.57	9.92 ± 2.30 ^b	10.88 ± 0.95 ^b	94	96
	Spring 1	1.42 ± 0.30	0.74 ± 0.12	2.12 ± 0.25	11.67 ± 1.73	5.64 ± 0.66	78	100
	Spring 2	1.86 ± 0.27	0.39 ± 0.12	1.69 ± 0.53 ^b	2.95 ± 0.29	1.63 ± 0.29	100	95
	Summer 2	1.26 ± 0.26	0.41 ± 0.20 ^a	1.21 ± 0.63 ^b	2.95 ± 0.31 ^b	0.80 ± 0.16	100	87
Site NO	Summer 1	8.28 ± 0.53	4.69 ± 0.59	5.04 ± 0.52	12.81 ± 2.16	5.49 ± 0.95	54 ^{Tox}	33 ^{Tox}
	Autumn 1	16.51 ± 1.40 ^b	11.11 ± 0.83	20.29 ± 0.87	127.05 ± 6.45	36.86 ± 2.09	67	100
	Autumn 2	3.81 ± 1.05	0.83 ± 0.27 ^b	8.29 ± 0.64 ^b	30.62 ± 2.98 ^b	18.84 ± 1.32	96	94
	Winter 1	9.87 ± 0.49	2.54 ± 1.14 ^b	432.84 ± 28.80 ^b	1048.23 ± 90.28	366.54 ± 23.46 ^b	95	33 ^{Tox}
	Winter 2	5.07 ± 0.44	3.86 ± 0.82	7.31 ± 0.61	16.67 ± 2.51	7.63 ± 0.75	51 ^{Tox}	98
	Spring 1	6.88 ± 0.92 ^b	0.97 ± 0.12	2.26 ± 0.47	8.60 ± 1.28	2.35 ± 0.47	57 ^{Tox}	100
	Spring 2	9.19 ± 0.77	8.94 ± 0.71	9.15 ± 1.03	6.32 ± 3.25 ^b	8.05 ± 0.99	48 ^{Tox}	100
	Summer 2	0.67 ± 0.15	0.54 ± 0.12	1.76 ± 0.33	5.55 ± 0.31	1.99 ± 0.26	100	24 ^{Tox}

Values represent mean ± standard deviation of revertants per µg of positive and indicative samples of mutagenic activity.

Values in boldface + TOX: presence of cytotoxicity. Negative controls (DMSO): 37.44 ± 15.28 (TA98); 37.66 ± 13.60 (TA98 + S9); 67.26 ± 32.93 (YG1021); 46.36 ± 30.49 (YG1024); 67.76 ± 38.53 (YG1024 + S9). Positive controls: 4NQO (TA98) 226.31 ± 104.25; 2AF (TA98 + S9) 186.75 ± 104.76; 2NF (YG1021) 1156.94 ± 331.62; 2NF (YG1024) 2298.43 ± 1076.02; 2AF (YG1024 + S9) 757.87 ± 371.50.

^a Indicative responses for mutagenesis.

^b Bernstein model, others with a linear model.

Table 3

Genotoxic analysis in the V79 cell line of organic extracts of PM2.5 of areas under the influence of the petrochemical industry.

Sites	Sample	Comet assay		Micronucleus test		
		Conc. 10 µg/ml		Conc. 10 µg/ml		Conc. 20 µg/ml
		Tail intensity		NI	MN	NI
Site NE	Summer 1	19.06 ± 24.66 ^b	1.200 ± 0.035 ^a	4	NT	NT
	Autumn 1	19.76 ± 21.17 ^c	1.477 ± 0.099	6	1.368 ± 0.037 ^a	5
	Autumn 2	19.01 ± 20.34 ^b	1.265 ± 0.094 ^b	2	NT	NT
	Winter 1	18.40 ± 21.71 ^b	1.231 ± 0.039 ^a	6	NT	NT
	Winter 2	38.02 ± 22.11 ^c	1.181 ± 0.028 ^c	2	NT	NT
	Spring 1	26.02 ± 23.70 ^c	1.373 ± 0.137	6	1.306 ± 0.023 ^c	4
	Spring 2	7.20 ± 12.63	1.317 ± 0.047 ^a	0	1.352 ± 0.040 ^b	9 ^a
	Summer 2	31.97 ± 27.53 ^c	1.190 ± 0.038 ^c	1	NT	NT
	Summer 1	34.77 ± 30.58 ^c	1.416 ± 0.162	7	1.352 ± 0.023 ^b	6
	Autumn 1	25.94 ± 20.89 ^c	1.445 ± 0.038	11 ^a	1.316 ± 0.091 ^b	2
SiteNO	Autumn 2	18.39 ± 20.46 ^b	1.429 ± 0.068	2	1.330 ± 0.016 ^c	4
	Winter 1	44.09 ± 29.37 ^c	1.477 ± 0.078	10 ^a	1.339 ± 0.023 ^c	4
	Winter 2	27.68 ± 22.97 ^c	1.272 ± 0.014 ^b	1	NT	NT
	Spring 1	36.13 ± 22.58 ^c	1.235 ± 0.013 ^a	6	NT	NT
	Spring 2	16.50 ± 16.47	1.230 ± 0.101 ^c	1	NT	NT
	Summer 2	21.22 ± 23.54 ^c	1.264 ± 0.097 ^b	4	NT	NT
	NC DMSO (Collection 1)	6.55 ± 8.00	1.446 ± 0.017	2	1.446 ± 0.030	1
	NC DMSO (Collection 2)	8.93 ± 11.47	1.494 ± 0.050	1		

NI = Nucleation Index; MN = Total number of micronuclei in 2000 cells; Letters show significant responses in relation to the negative control: a $P \leq 0.05$; b $P \leq 0.001$ and c $P \leq 0.0001$; NT = Not tested due to toxicity in 10 µg/mL. NC- Negative control. Mean number of micronuclei in the parallel positive controls: 18 ± 4. Tail intensity of the positive controls: Collection 1 = 30.72 ± 25.48; Collection 2 = 29.04 ± 22.52.

lead to pollutant reduction, independent of absolute concentrations defined in relation to some arbitrary value (Heal et al., 2012). In this context, it is important to develop and apply simple *in vitro* tests to determine the relative toxicity of environmental particles as in the present study.

In Brazil applying particulate reduction plans is more complex since the limits for PM2.5 have not yet been legally established. However, the results of the present study show the need for further efforts to reduce these particulates, even if the levels of pollution are already below the current international guidelines, so as to limit and reduce potentially damaging exposure to PM2.5.

In our study, mutagenic activity was detected through the Ames test in all samples of fine inhalable particulates, predominantly with direct action compounds, since the mutagenic potency was reduced in the assays in the presence of metabolic activation. Claxton et al. (2004) showed that hundreds of compounds of various chemical classes present in the atmosphere are mutagenic. The authors also showed that although PAHs, indirect mutagenic substances, are the most monitored compounds in air quality studies, these compounds are not responsible for most of the mutagenesis of these particles.

In Brazil, studies about the mutagenic effect of PM2.5 have only recently begun (Lemos et al., 2012), and few papers have been published so far. Silva et al. (2015) evaluated an area considered a reference for air quality in previous studies in the south of Brazil, resulting in lower mutagenicity than that observed in the present study, with maximum values of 8.30 ± 0.69 (TA98) and 5.40 ± 0.36 (TA98 + S9) rev/m³. It should be underscored that in this area of reference, episodes of negative mutagenesis were observed, highlighting the lower air quality observed in the city of Triunfo, which had responses ranging from 0.45 ± 0.22 to 18.16 ± 1.54 rev/m³. The mutagenic potency of these results is similar to those found in an urban-industrial area, also in the south of Brazil, under the influence of an oil refinery (Lemos, 2011), which varied from 0.27 ± 0.10 to 17.80 ± 2.01 rev/m³ (TA98) and from 0.47 ± 0.06 to 6.90 ± 0.76 rev/m³ (TA98 + S9). Comparing investigations regarding PM2.5 in an area contaminated by wood preservatives (maximum at TA98 24.81 ± 1.83 rev/m³), also located in Triunfo (Coronas et al., 2016), to the urban centers of Porto Alegre (maximum at TA98

24.00 ± 2.55 rev/m³) and Rio de Janeiro (maximum at TA98 56.40 ± 20.60 rev/m³), (Brito et al., 2013; Rainho et al., 2013), our data present less mutagenic activity in these basic strains at 1.37; 1.32 and 3.11 times, respectively.

Direct mutagenesis in the *Salmonella*/microsome assay is partly attributed to the effect of nitrogenated compounds in the samples. This was confirmed by the use of specific strains YG1021 and YG1024, which indicated the presence of nitro compounds in almost all samples of PM2.5. Umbuzeiro et al. (2008) evaluated the mutagenic activity of different fractions of the organic matter extracted from urban atmospheric particles and found that the nitro-PAHs fraction was the most potent inducer in the *Salmonella*/microsome assay. Nitroarenes are polycyclic aromatic hydrocarbons characterized by the presence of one or more nitrogenated radicals and are widely distributed throughout the environment. Many of these compounds are characterized as major pollutants because they are the result of anthropogenic activities (Oliveira et al., 2010).

Nitro compounds must undergo enzymatic reduction to exert their toxic effects. Nitroreductase and O-acetyltransferase enzymes play a major role in reducing the nitro radicals, leading to the formation of hydroxylamines, which are reactive, potent mutagenic agents (Watanabe et al., 1989). The high mutagenic activity in strains YG1021 and YG1024 increases the sensitivity of the Ames test to detect these compounds. Although these enzymes are present mainly in eubacteria, they have an important relationship to human exposure to environments contaminated with nitro-PAHs. In the human body, nitrocompounds may be reduced by the intestinal microbiota, constituted by a complex and relatively stable community of anaerobic microorganisms. Thus, nitroreductases present in the microbial community of the bowel act to transform nitroaromatic chemical substances to which the host is exposed, and may generate toxic byproducts (Oliveira et al., 2010).

In the organic extracts of PM2.5 evaluated, dinitroarene group compounds predominated, as evidenced by the higher responses in strain YG1024 in almost all samples. A greater sensitivity of strain YG1024 to detect mutagenic nitroarenes was observed in other studies of different MP fractions in petrochemical industry areas (Coronas et al., 2009; Pereira, 2008; Pereira et al., 2010), evidencing

the applicability of this strain to evaluating particulate matter from sites impacted by that industry type. On the other hand, strain YG1021 presented higher results compared to YG1024 in investigations of the PM of urban environments (Coronas et al., 2016; Brito et al., 2013; Käffer et al., 2012; Silva et al., 2015; Zwodziazk et al., 2001). Considering this relationship, the results of the present study evidence a greater contribution of nitroarenes from industrial sources in the two areas evaluated.

The highest response for the presence of dinitroarenes (YG1024) attained prominent values, reaching 1048.23 ± 90.28 rev/ μg in the Winter 1 period at Site NO. Apel et al. (2010) performed the chromatographic analysis for the presence of nitronaphthalenes in samples of total suspended particles (TSPs) and coarse inhalable particles (PM10) collected close to the petrochemical complex of Triunfo (6.1 Km from the chimney of raw materials center, which are the object of the present study). The authors showed the predominance of dinitronaphthalenes for the samples corresponding to the winter months, both for TSPs and PM10. Also, concordantly, the evaluation of the TSP and PM10 mutagenicity at the site mentioned also presented the highest responses in winter (Coronas et al., 2008).

Nitro-PAHs can be emitted directly by sources of combustion or occur as the result of secondary reactions in the atmosphere between PAHs and nitrogen oxides- NOx (Zwodziazk et al., 2001). Traversi et al. (2011) found a strong correlation between the mutagenic potency of PM10 and PM2.5 and the nitrogen oxides concentrations present in the atmosphere. It is interesting to observe that during the period corresponding to the Winter 1 samples, the NOx indices were altered in the area of study, attaining the highest values of the year, up to $75 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (CEVS, 2013). During this period, at Site NO, the highest mutagenic potencies also occurred for nitroarenes and aromatic amines (YG1021, YG1024 e YG1024 + S9), indicating the possible influence of NOx levels in the atmosphere, with the subsequent mutagenicity of the particulate matter. NOx had already been named as the main pollution problem at the petrochemical complex in a study modeling the airborne dispersion of routinely monitored pollutants (Cunha, 2002).

Another result that draws attention in the study is those observed during the Autumn 1 period, in which both sampling sites presented a high mutagenic potency in all strains. In the period corresponding to these samples, an episode of hydrocarbon and benzene leakage was observed in the petrochemical complex, leading to the evacuation of the industrial area (Sindipolo, 2013). This episode may have influenced the responses obtained for mutagenicity, due to the presence of hydrocarbons, since benzene does not remain in the samples and the assay is not sensitive to this compound.

The presence of aromatic amines was detected through the high indirect response obtained in strain YG1024 + S9, especially in the Autumn and Winter months. The results for nitroarenes and aromatic amines were higher at Site NO. The maximum values for each strain were also higher than the maximum values observed in previous studies in the state for 4 areas (Triunfo, Porto Alegre, Rio Grande and Santo Antônio da Patrulha), (Coronas et al., 2016; Brito et al., 2013; Lemos et al., 2012; Silva et al., 2015).

Aromatic amines are associated with emissions from industrial processes and only four compounds have been detected in samples of airborne particulate matter so far: Aniline, 1-aminonaphthalene, Betanaphthylamine and 4-aminobiphenyl (Akyuz, 2008; Claxton et al., 2004). The aniline is not mutagenic in the Salmonella assay, nor does it induce chromosomal breaks in V79 (IARC, 1982), however the other aromatic amines cited are Salmonella positive (Claxton et al., 2004).

Studies looking at the genotoxic potential of airborne particulate matter samples mainly use the reverse mutation assay in

Salmonella, but few studies used mammalian cells in their evaluations (Claxton and Woodall, 2007). In this context, in order to expand the biological systems used, evaluations of the genotoxicity of organic extracts of PM2.5 were also performed in cultures of lung cells of Chinese hamster (V79) using the comet assay and micronuclei test.

In the present study, the genotoxicity found in the cell cultures of V79 exposed to a concentration of $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ of organic extract, presented a greater number of positive responses in the comet assay (87.5%), compared to micronuclei induction analysis (12.5%). These results suggest that most of the damage observed can still be repaired, since the associated clastogenicity was not found in most of the samples. It was also observed that 31% of the samples evaluated in the comet assay presented higher tail intensity than the respective parallel positive controls, evidencing high genotoxicity in these samples (Summer 1, Winter 1 and Spring 1 at Site NO; and Winter 2 and Summer 2 at Site NE). Brito et al. (2013), evaluating the genotoxicity of PM2.5 in V79 cells in an urban area, found a positive response in the comet assay in 30% of the samples, negative responses for the induction of micronuclei and low cytotoxicity. Comparatively, the areas under petrochemical influence evaluated in the present study show greater genotoxic damage, possibly due to the emission sources involved. It should be underscored that many samples presented high MN numbers, even if they were not statistically significant. In these cases the values were higher than double those found in the parallel controls. The toxicity observed in all samples may have made it difficult to induce micronuclei, resulting in false negatives.

The concentration of $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ was used only in the Micronuclei Test in the samples with a nucleation index greater than 1.3 provoking toxic responses in all assays. Only the Spring 2, Site NE sample also induced the formation of MN at this concentration, although in $10 \mu\text{g}/\text{mL}$, it did not present MN, nor damage according to the Comet assay, suggesting that the positive response was caused by increased concentration.

Saito et al. (1984) observed the occurrence of simple breaks in the DNA of V79 cells caused by 1-nitropyrene (1-NP), 1,6-dinitropyrene (1,6-DNP), 1,8-dinitropyrene (1,8-DNP), 1-nitrosopyrene (1-NOP) and 1-aminopyrene (1-AP). 1-NP was the compound that produced the largest number of breaks among the substances evaluated. The reduction of 1-NP was, also found, in V79 cells by Salmeen et al. (1983). Since this group of compounds was detected by the Salmonella/microsome assay producing mutagenicity in all samples, it is possible that the responses found in the Comet Assay may be related to these compounds. However, the effect of complex interactions between the substances that constitute the extracted organic matter has not been ruled out.

Oh et al. (2011), investigating the action of different fractions of organic extract of PM2.5 in mammalian cells (BEAS-2B) observed three active genotoxic fractions composed by aliphatic and chlorinated hydrocarbons (aliphatic fraction), PAHs and their alkyl derivatives (aromatic fraction) and nitro-PAHs, ketone and quinones (mildly polar fraction, besides a toxic fraction containing nitrated heterocyclic compound such as pyridines, quinolines and acridines). The mutagenicity of the airborne particles evaluated by the Salmonella/microsome assay is associated with the moderately polar to polar classes of compounds, that tend to contain nitroaromatic compounds, aromatic amines and aromatic ketones (Claxton et al., 2004; De Martinis et al., 1999).

Cytotoxicity induced by the organic extracts of PM2.5 in V79 cells in direct assays, evaluated by the nucleation index, was present in all samples, considering the two concentrations used. Motykiewicz et al. (1991) analyzed the different fractions of organic extracts of PM10 and observed that the fraction containing PAHs produced effects on the mitotic cell division of V79 cells, attributing

this to the presence of benzo(a)pyrene, whose action on cell division and induction of aneuploidies had already been determined previously. These effects have also been verified in the study by Hadnagy et al. (1997), using a complex mixture of PAHs in V79 cells.

The positive induction of MN by samples collected in Autumn 1 and Winter 1 from Site NO, as well as the increased values found in these same samplings at Site NE may be related to HC leakage, and also benzene, besides high levels of NO_x, respectively, already cited previously.

5. Conclusions

The results obtained in the three biomarkers used – reverse mutation in *Salmonella*, damage through comet assay and micronuclei induction in V79 cells – were concordant in characterizing Site NO as being of worse quality, compatible with the greater dispersion of pollutants in the first wind direction.

The *Salmonella*/microsome assay proved sensitive and efficient to characterize the mutagenicity of inhalable particulate matter. The analysis of the dose-response curve by linear regression allows quantifying mutagenic potency per cubic meter of air sampled, a useful approach in comparative studies of the PM from different sources and in risk analysis. The association of strains sensitive to nitrocompounds in the study evidenced the role that these substances play in the mutagenicity of PM_{2.5}, and the importance of developing monitoring practices for its levels or effects on the environment, since the mutagenic effect detected would be limited through the classic strains. Furthermore, the YG1024 strain, in the presence of metabolic activation, allowed the detection of mutagenic aromatic amines in the samples, a group of compounds that have not yet been well evaluated in the airborne particles.

Since the international agencies recommend a battery of assays to evaluate the genotoxicity of complex mixtures, the analyses of PM_{2.5} using comet assay and the micronucleus test have broadened the levels of response, complementing the findings of the *Salmonella*/microsome assay. The set of responses involves direct and indirect mechanisms for the induction of different damages. Our results show that the complex composition of PM_{2.5} can provoke various genotoxic effects, and the use of different bioassays is essential to understand the effects of this complex matrix.

The results obtained support the recommendations of IARC and WHO as to the inexistence of safe limits for exposure to airborne particulate matter.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Juliana da Silva for her help with Comet Assay *Software* and FEPAM's air sampling team. This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Grants n° 307884/2011-2. The Coordination of Future Training of Higher Education staff (CAPES) granted A.T. Lemos a Doctoral fellowship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.087>.

References

- 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.
- Akyüz, M., 2008. Simultaneous determination of aliphatic and aromatic amines in ambient air and airborne particulate matters by gas chromatography-mass spectrometry. *Atmos. Environ.* 42, 3809–3819.
- Apel, M.A., Rocha, J.A.V., Coronas, M.V., Vargas, V.M.F., 2010. Análise Exploratória da Incidência de Nitronaftalenos no Material Particulado Atmosférico em Área de Influência Petroquímica. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 5, 55–62. <http://dx.doi.org/10.5132/jbse.2010.01.009>.
- Bahadori, A., 2014. Air pollution control. In: *Pollution Control in Oil, Gas and Chemical Plants*. Springer, Switzerland. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-01234-6>.
- Bernstein, L., Kaldor, J., McCann, J., Pike, M.C., 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat. Res.* 97, 267–281.
- 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_{2.5}) using *Salmonella*, plants and mammalian cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 94, 14–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.04.014>.
- CEVS- Centro Estadual de Vigilância em Saúde, 2013. Boletim Informativo Do VIGIAR/RS VIGIAR/NVRAnB/DVAS/CEVS/SES-RS. N° 30 de 05/08/2013.
- Chan, C., Shie, R., Chang, T., Tsai, D., 2006. Workers' exposures and potential health risks to air toxics in a petrochemical complex assessed by improved methodology. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 79, 135–142. <http://dx.doi.org/10.1007/s00420-005-0028-9>.
- 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.
- Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Stetina, R., 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23, 143–151.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.084>.
- Cunha, R.M.P., 2002. Estudo do transporte de poluentes na região do polo petroquímico localizado em Triunfo-RS. Dissertação de mestrado. (Centro Estadual de Pesquisa em Sensoriamento Remoto e Meteorologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 136.
- De Martinis, B.S., Kado, N.Y., De Carvalho, L.R., Okamoto, R.A., Gundel, L.A., 1999. Genotoxicity of fractionated organic material in airborne particles from São Paulo, Brazil. *Mutat. Res.* 446, 83–94.
- Energética, 2012. Manual de operação do amostrador de grande volume Modelo MP2.5-High volume sampler PM_{2.5}: operating manual. Rio de Janeiro, p. 118.
- Fajersztajn, L., Veras, M., Barrozo, L.V., Saldiva, P., 2013. Air pollution: a potentially modifiable risk factor for lung cancer. *Nat. Rev. Cancer* 13, 674–678. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3572>.
- Fenech, M., 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.* 285, 35–44.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455, 81–95.
- Fenech, M., Bonassi, S., 2011. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 26, 43–49.
- FEPAM, 2008. Estratégias ecotoxicológicas para avaliação de risco aplicadas a bacia hidrográfica do Rio Cai: Atlas ambiental. Fundação Estadual de Proteção Ambiental, Porto Alegre, p. 164.
- Hadnagy, W., Sust, H., Seemayer, N.H., 1997. Induction of cell division disturbances in chinese hamster lung cell line V79 by a complex mixture of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Aza-Heterocyclic compounds. *Toxicol. Vitro* 11, 703–709.
- Hartmann, A., Elhajouji, A., Kiskinis, E., Poetter, F., Martus, H.J., Fjällman, A., Friauff, W., Suter, W., 2001. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. *Food Toxicol.* 39, 843–858.
- Heal, M.R., Kumar, P., Harrison, R.M., 2012. Particles, air quality, policy and health. *Chem. Soc. Rev.* 6606–6630.
- Ianistckí, M., Dallalosa, J., Sauer, C., Teixeira, E.C., Da Silva, J., 2009. Genotoxic effect of polycyclic aromatic hydrocarbons in the metropolitan area of Porto Alegre, Brazil, evaluated by *Helix aspersa* (Müller, 1774). *Environ. Pollut.* 157, 2037–2042.
- IARC, 1982. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans – Some Aromatic Amines, Anthraquinones and Nitroso Compounds, and Inorganic Fluorides Used in Drinking-water and Dental Preparations. International Agency for Research on Cancer, p. 341, 27.
- IARC, 2015. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans: Outdoor Air. International Agency for Research on Cancer, 109, Lyon, France.
- IARC, 2010. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans – Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some

- Related Exposures. International Agency for Research on Cancer, 92, Lyon, France.
- IBGE, 2015. Diretoria de Pesquisas - DPE - Coordenação de População e Indicadores Sociais - COPIS. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=432200>.
- Kado, N.Y., Langley, D., Eisenstadt, E., 1983. A simple modification on the *Salmonella* liquid-incubation assay: increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat. Res.* 121, 25–33.
- 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.
- Kim, K.H., Kabir, E., Kabir, S., 2015. A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environ. Int.* 74, 136–143.
- Lemos, A.O., Oliveira, N.C.D., Lemos, C.T., 2011. In vitro micronuclei tests to evaluate the genotoxicity of surface water under the influence of tanneries. *Toxicol. In Vitro* 25, 761–766.
- Lemos, A.T., 2011. Investigação de contaminantes mutagênicos de matrizes ambientais em área de risco ecotoxicológico. Dissertação de mestrado (Ecologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 132.
- 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.
- Lepers, C., Dergham, M., Armand, L., Billet, S., Verdin, A., Andre, V., Pottier, D., Courcot, D., Shirali, P., Sichel, F., 2014. Mutagenicity and clastogenicity of native airborne particulate matter samples collected under industrial, urban or rural influence. *Toxicol. In Vitro* 28, 866–874. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2014.03.011>.
- Lippmann, M., 2012. Particulate matter (PM) air pollution and health: regulatory and policy implications. *Air Qual. Atmos. Health* 5, 237–241. <http://dx.doi.org/10.1007/s11869-011-0136-5>.
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113, 173–215.
- Meire, R.O., Azeredo, A., Torres, J.P.M., 2007. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Oecol. Bras.* 11, 188–201.
- Mesquita, S.R., Drooge, B. L. v., Barata, C., Vieira, N., Guimarães, L., Piña, B., 2014. Toxicity of atmospheric particle-bound PAHs: an environmental perspective. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 11623–11633. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-2628-y>.
- Motykwicz, G., Hadnagy, W., Seemayer, N.H., Szeglia, J., Tkocz, A., Chory, M., 1991. Influence of airborne suspended matter on mitotic cell division. *Mutat. Res.* 260, 195–202.
- Nadal, M., Mari, M., Schuhmacher, M., Domingo, J.L., 2009. Multi-compartmental environmental surveillance of a petrochemical area: levels of micropollutants. *Environ. Int.* 35, 227–235.
- Nunes, E.A., Lemos, C.T., Gavronski, L., Moreira, T.N., Oliveira, N.C.D., Silva, J., 2011. Genotoxic assessment on river water using different biological systems. *Chemosphere* 84, 47–53.
- OECD, 2010. OECD guideline for the testing of chemicals. *In Vitro Mamm. Cell Micronucleus Test* 487, 26.
- Oh, S.M., Kim, H.R., Park, Y.J., Lee, S.Y., Chung, K.H., 2011. Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells). *Mutat. Res.* 723, 142–151.
- Oliveira, I.M., Bonatto, D., Henriques, J.A.P., 2010. Nitroreductases: enzymes with environmental, biotechnological and clinical importance. *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.* 1008–1019.
- Park, S.Y., Choi, J., 2007. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. *Environ. Int.* 33 (6), 817–822. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2007.03.014>.
- Pereira, T.S., 2008. Biomonitoramento de populações humanas através de avaliação de genotoxicidade em áreas sujeitas a risco ecotoxicológico. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 179. Tese de Doutorado (ecologia).
- 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.
- Rainho, C.R., Corrêa, S.M., Mazzei, J.L., Aiub, C.A.F., Felzenszwalb, I., 2013. Genotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Nitro-Derived in Respirable Airborne Particulate Matter Collected from Urban Areas of Rio de Janeiro (Brazil). *BioMed Res. Int.* 2013, 1–9. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/765352>.
- Saito, K., Mita, S., Kamataki, T., Kato, R., 1984. DNA single-strand breaks by nitro-pyrenes and related compounds in chinese hamster V79 cells. *Cancer Lett.* 24, 121–127.
- Salmeen, I., Zacmanidis, P., Ball, J., 1983. 1-Nitropyrene reduction by *Salmonella typhimurium*, V79 Chinese hamster and primary rat liver cells. *Mutat. Res.* 122, 23–28.
- 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_{2.5}) associated with genetic biomonitoring in children. *Mutat. Res.* 778, 44–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.11.006>.
- Sindipolo, 2013. Em dia- Boletim Informativo do Sindicato dos Trabalhadores nas Indústrias Petroquímicas de Triunfo/RS - SINDIPOLO. Nº 1623 11 a 15/11/2013. Disponível em. www.sindipolo.org.br.
- Speit, G., Hartmann, A., 1999. The comet assay (Single-Cell gel test): a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: *DNA Repair Protocols*. Humana Press, New Jersey, pp. 203–212.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221.
- Traversi, D., Schilirò, T., Degan, R., Pignata, C., Alessandria, L., Gilli, G., 2011. Involvement of nitro-compounds in the mutagenicity of urban PM_{2.5} and PM₁₀ in Turin. *Mutat. Res.* 726, 54–59.
- Umbuzeiro, G.A., Franco, A., Martins, M.H., Kummrow, F., Carvalho, L., Schmeiser, H.H., Leykauf, J., Stiborova, M., Claxton, L.D., 2008. Mutagenicity and DNA adduct formation of PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH fractions of atmospheric particulate matter from São Paulo, Brazil. *Mutat. Res.* 652, 72–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.12.007>.
- 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., 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.
- Vargas, V.M.F., Motta, V.E.P., Henriques, J.A.P., 1993. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat. Res.* 319, 31–45.
- Watanabe, M., Ishidate Jr., M., Nohmi, T., 1989. A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. *Mutat. Res.* 216, 211–220.
- Watanabe, M., Ishidate Jr., M., Nohmi, T., 1990. Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels. *Mutat. Res.* 234, 337–348.
- WHO, 2006. Air Quality Guidelines for Particulate Matter, Ozone, Nitrogen Dioxide and Sulfur Dioxide. World Health Organization, Geneva. Global update 2005.
- WHO, 2013. Review of Evidence on Health Aspects of Air Pollution. World Health Organization (REVIHAAP PROJECT: Technical Report).
- Zar, J.H., 1996. *Biostatistical Analysis*, third ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Zapata, L.M., Bock, B.C., Orozco, L.Y., Palacio, J.A., 2016. Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotóxico monitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 127, 108–116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.01.016>.
- Zwozdziak, J., Jadczyk, P., Kucharczyk, J., 2001. Seasonal variability of the mutagenicity of airborne particles in the town center. *J. Aerosol. Sci.* 32, 409–423.

Supplementary content:

Table A.1 – Mutagenicity in revertants/m³ of organic extracts of fine inhalable particles in areas under the influence of a petrochemical industry

Sample		TA98	TA98+S9	YG1021	YG1024	YG1024+S9
Site NE	Summer 1	2.63 ± 0.32	1.98 ± 0.38	2.23 ± 0.29	5.20 ± 0.90	3.12 ± 0.21
	Autumn 1	18.07 ± 1.25	9.50 ± 0.57 ^b	21.08 ± 1.35	90.07 ± 9.65	34.95 ± 2.00 ^b
	Autumn 2	8.15 ± 1.26 ^b	4.84 ± 0.54	7.68 ± 0.90 ^b	45.02 ± 5.80 ^b	16.63 ± 2.25
	Winter 1	8.69 ± 0.37 ^b	5.55 ± 0.18	8.54 ± 1.05	9.49 ± 1.93	13.30 ± 0.68
	Winter 2	9.89 ± 1.07	5.41 ± 0.42	6.84 ± 0.61	10.61 ± 2.46 ^b	11.64 ± 1.02 ^b
	Spring 1	1.05 ± 0.22	0.55 ± 0.09	1.57 ± 0.18	8.63 ± 1.28	4.17 ± 0.49
	Spring 2	4.43 ± 0.64	0.93 ± 0.28	4.02 ± 1.26 ⁱ	7.02 ± 0.69	3.88 ± 0.69
	Summer 2	1.39 ± 0.29	0.45 ± 0.22 ⁱ	1.33 ± 0.69 ⁱ	3.24 ± 0.34 ^b	0.88 ± 0.18
Site NO	Summer 1	5.63 ± 0.36	3.19 ± 0.40	3.43 ± 0.35	8.71 ± 1.47	3.73 ± 0.64
	Autumn 1	18.16 ± 1.54 ^b	12.22 ± 0.91	22.32 ± 0.96	139.75 ± 7.09	40.55 ± 2.29
	Autumn 2	5.56 ± 1.53	1.21 ± 0.39 ^b	12.10 ± 0.93 ^b	44.70 ± 4.35 ^b	27.50 ± 1.93
	Winter 1	12.34 ± 0.61	3.17 ± 1.42 ^b	541.05 ± 36.00 ^b	1310.29 ± 122.85	458.17 ± 29.32 ^b
	Winter 2	7.05 ± 0.61	5.36 ± 1.14	10.16 ± 0.85	23.17 ± 3.49	10.60 ± 1.04
	Spring 1	4.95 ± 0.66 ^b	0.70 ± 0.09	1.63 ± 0.34	6.19 ± 0.92	1.69 ± 0.34
	Spring 2	6.89 ± 0.57	6.70 ± 0.53	6.86 ± 0.77	4.74 ± 2.44 ^b	6.04 ± 0.74
	Summer 2	0.82 ± 0.18	0.82 ± 0.18	2.67 ± 0.50	8.44 ± 0.47	3.02 ± 0.39

Values represent mean ± standard deviation of revertants per m³ of air sampled of positive and indicative samples of mutagenic activity. ⁱ indicative responses for mutagenesis. ^b Bernstein model, others with a linear model. Negative controls (DMSO): 37.44 ± 15.28 (TA98); 37.66 ± 13.60 (TA98+S9); 67.26 ± 32.93 (YG1021); 46.36 ± 30.49 (YG1024); 67.76 ± 38.53 (YG1024+S9). Positive controls: 4NQO (TA98) 226.31 ± 104.25; 2AF (TA98+S9) 186.75 ± 104.76; 2NF (YG1021) 1156.94 ± 331.62; 2NF (YG1024) 2298.43 ± 1076.02; 2AF (YG1024+S9) 757.87 ± 371.50.

3.2. CAPÍTULO 2 - “ESTUDO INTEGRADO DE BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE EM ESCOLARES E PARTÍCULAS INALÁVEIS DE ÁREAS COM INFLUÊNCIA PETROQUÍMICA”

Artigo a ser submetido à revista *Environment International*

**ESTUDO INTEGRADO DE BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE EM ESCOLARES E
PARTÍCULAS INALÁVEIS DE ÁREAS COM INFLUÊNCIA PETROQUÍMICA**

Andréia Torres Lemos ^{a,b}, Clarice Torres de Lemos ^b, Mariana Vieira Coronas ^b, Jéssica Rosiak da Rocha ^b, Vera Maria Ferrão Vargas ^{a,b}

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

^b *Departamento de Pesquisas e Análises Laboratoriais, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM), Rua Aurélio Porto, 37, Partenon, CEP 90620-090 Porto Alegre, RS, Brasil.*

Resumo

Estudos em áreas próximas a indústrias petroquímicas vêm mostrando a presença de compostos genotóxicos no material particulado atmosférico (MP). O presente estudo empregou biomarcadores de genotoxicidade em sangue periférico e em mucosa oral de escolares de duas áreas localizadas na primeira direção dos ventos, a partir de um complexo industrial petroquímico, associado à caracterização do potencial mutagênico das partículas inaláveis desses locais. Foi realizada a coleta de sangue periférico e células esfoliadas da mucosa oral em 54 crianças (5-12 anos) de duas escolas públicas, a 2,5Km (Local NO), e a 35Km (Local NO II) de distância da principal fonte emissora. Em sangue periférico foi utilizado o ensaio cometa (EC), avaliando o parâmetro intensidade de cauda; e o Ensaio do micronúcleo (MN) com bloqueio da citocinese -citoma (CBMN-cyt) para avaliar as frequências de células com MN, brotos nucleares (NBUDs) e pontes nucleoplásmicas (NPBs). Utilizou-se o Ensaio do MN em mucosa oral-citoma (BMCyt) para detectar MN e anomalias nucleares. A mutagenicidade de extratos orgânicos do MP desses locais, além de um local na segunda direção dos ventos (NE), foi avaliada pelo *Salmonella*/microssoma, método de microssuspensão, através das linhagens TA98, YG1021 e YG1024 em presença/ausência de fração de metabolização (S9). O local NO, mais próximo ao complexo petroquímico, apresentou pior qualidade do ar, evidenciado por maior mutagenicidade e perfil de HPAs mais tóxico (Σ TEQ) no MP. Danos ao DNA (EC) foram significativamente mais elevados no local mais próximo à fonte industrial, NO ($10,65 \pm 0,78$) em relação ao local NO II ($6,73 \pm 0,92$). A frequência de MN no CBMN-cyt não diferiu entre os grupos, porém, foram significativamente maiores que um local de referência externa. NBUDs foram significativamente mais elevados no local NO II. Quanto ao BMCyt, não houve diferença entre os grupos para MNs e NBUDs. As frequências das alterações nucleares, cariorréxis e cariólise, foram significativamente mais elevadas no local NO II. A avaliação ambiental mostrou que mesmo amostras dentro dos limites de MP, apresentam potencial genotóxico. Os resultados, conjuntamente, evidenciam que as crianças avaliadas estão expostas a uma mistura de contaminantes de diferentes fontes, sendo a proximidade da indústria petroquímica um contribuinte aos fatores de risco. Medidas são necessárias para identificar e reduzir emissões e efeitos perigosos, uma vez que os padrões de qualidade do ar não são suficientes para garantir a saúde das populações expostas.

Palavras chave: PM2.5; MP10; teste de Ames; teste de micronúcleos; ensaio cometa; biomarcadores em crianças.

1. Introdução

Estimativas da Organização Mundial de Saúde reportam que a poluição atmosférica é responsável por 3 milhões de mortes, anualmente, afetando todas as regiões do globo terrestre (WHO, 2016). O Material Particulado (MP) é um importante indicador da poluição do ar e um fator de risco significativo para a incidência e o agravamento de problemas de saúde humana (Pope et al., 2002; Morakinyo et al., 2016; Vargas, 2003). Este poluente consiste de uma mistura heterogênea de partículas sólidas e líquidas em suspensão na atmosfera, incluindo nitratos, sulfatos, carbono elementar e orgânico, compostos orgânicos, metais e compostos biológicos (WHO, 2013). A principal forma de classificação destas partículas refere-se a seu diâmetro aerodinâmico (tamanho da partícula), sendo que as partículas com diâmetro inferior a 10 μ m (MP10) compõem a fração inalável do ar, e aquelas com até 2.5 μ m (MP2,5) a fração mais associada aos efeitos adversos à saúde (Englert, 2004).

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classificou a poluição atmosférica, em especial o MP, como carcinogênica para humanos (IARC, 2015), tornando-se mais preocupante a observação recente da OMS de crescimento de 8% nos níveis anuais de partículas atmosféricas no planeta, em período de cinco anos (WHO, 2016). 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 para as populações que vivem no entorno dessas emissões (WHO, 2005). Estudos em áreas próximas a indústrias do ramo petroquímico vêm mostrando a presença de compostos genotóxicos no MP (Coronas et al., 2008; Coronas et al., 2009; Lemos et al., 2012; Lemos et al., 2016; Pereira et al., 2010; Pereira et al., 2013; Vargas, 2003).

Os biomarcadores podem ser usados como importantes ferramentas para a investigação da mutagênese ambiental, permitindo que protocolos de prevenção e intervenção sejam implementados. Fornecem dados científicos valiosos devido a sua capacidade de detectar mecanismos biológicos pela análise de eventos moleculares e celulares iniciais, intermediários e tardios (Gallo et al., 2011; Van der oost et al., 2003). No monitoramento ambiental de diferentes matrizes como ar, água e solo, os biomarcadores são empregados para detectar substâncias químicas e seus efeitos. No estudo da genotoxicidade do compartimento atmosférico, o ensaio *Salmonella*/microsoma é a metodologia mais utilizada para detecção do potencial mutagênico do MP (Claxton et al., 2004). O ensaio de mutação reversa emprega

linhagens bacterianas auxotróficas para histidina, detectando mutações em nível molecular. O uso de diferentes linhagens, com mutações específicas em determinados genes do operon da histidina, permite caracterizar mutágenos que agem através de mecanismos distintos, possibilitando caracterizar as classes de compostos responsáveis pelo efeito observado (Maron e Ames, 1983; Mortelmans e Zeiger, 2000; Watanabe, 1989; 1990).

A associação de biomarcadores nas matrizes ambientais e nas populações afetadas produz dados mais robustos para avaliar os efeitos de poluentes na saúde humana facilitando a identificação das fontes de exposição e medidas para minimização de emissões. Estudos em genética toxicológica, incluindo biomonitoramento humano, salientam a necessidade de aplicar vários ensaios de genotoxicidade, sendo que entre os testes disponíveis, o ensaio cometa (EC) e o teste de micronúcleos (MN) são amplamente utilizados para a avaliação de danos no DNA (Collins et al., 2014; Fenech et al., 2011; Hartmann et al., 2003). O Ensaio Cometa, em sua versão alcalina ($>pH 13$), detecta o mais amplo espectro de lesões ao DNA como fragmentos resultantes de quebras de fita simples ou dupla, lesões em sítios álcali-lábeis (sítiosapurínicos ou apirimidínicos) e reparo incompleto dos sítios de excisão (Hartmann et al 2003; Collins et al., 2008). Essas quebras podem ser reparadas, resultando em efeitos não persistentes, ser letais à célula ou ser fixadas em mutações permanentes viáveis ou danos cromossômicos associados a doenças, incluindo o câncer (OECD, 2016). Micronúcleos são cromossomos inteiros ou seus fragmentos acêntricos, expelidos do núcleo principal nos últimos estágios da anáfase, podendo ser formados por disfunções no aparato mitótico (aneugênese) ou quebras (clastogênese), respectivamente (Fenech, 2000; Fenech e Bonassi, 2011).

A combinação destes dois ensaios citogenéticos pode ser considerada como a melhor bateria de testes, devido sua alta sensibilidade, poder estatístico, simplicidade, versatilidade, baixo custo e rapidez (Araldi et al., 2015). O uso destes biomarcadores para verificar os efeitos adversos da poluição atmosférica para a saúde humana pode ser realizado em crianças, permitindo esta análise em fase sensível do desenvolvimento humano.

A infância caracteriza-se como o período de maior suscetibilidade aos efeitos danosos da poluição do ar, uma vez que o epitélio das vias respiratórias em fase de crescimento é mais permeável aos poluentes, e suas defesas contra a ação de partículas e gases não está completamente desenvolvida (Salvi, 2007). A maior vulnerabilidade das crianças aos efeitos

agudos e crônicos de poluentes ambientais envolve muitos fatores, mas, segundo Wild e Kleinjans (2003), estes podem ser agrupados em três grandes áreas: a) maior exposição/absorção as toxinas ambientais relativamente aos adultos; b) dose biologicamente ativa, pois pode haver diferenças na quantidade de toxinas que atingem o órgão alvo; c) precocidade da exposição, que permite muito tempo para que esta se torne crônica e que os efeitos adversos à saúde se manifestem.

O objetivo deste estudo foi avaliar biomarcadores de genotoxicidade (danos primários ao DNA pelo EC e análise de MN) em sangue periférico e mucosa oral de escolares de duas áreas localizadas na primeira direção dos ventos, a partir de um complexo industrial petroquímico, associado à caracterização do potencial mutagênico (Ensaio *Salmonella*/microsoma) das partículas inaláveis locais.

2. Material e Métodos

2.1. Área de estudo

A área de estudo localiza-se em Triunfo (29°56'36"S e 51°43'05"O), RS/Brasil, apresentando característica mista rural, urbana, industrial, e está sob influência de um complexo petroquímico de 3.600 hectares. Compõem este complexo, indústrias de primeira e segunda geração de petroquímicos, produzindo 1.452 toneladas de eteno anualmente. Ainda são produzidos benzeno, tolueno, xileno, propano, butadieno, MTBE e butano-1. Amostras de material particulado atmosférico desta região apresentaram genotoxicidade em estudos prévios (Fepam, 2008; Lemos, et al., 2016).

Partindo da principal fonte de emissões atmosféricas do complexo petroquímico, dois locais foram selecionados na área de deposição máxima de MP_{2,5}, na primeira (NO) e segunda (NE) direção preferencial dos ventos na região. Esses dois locais foram determinados com base no modelo de dispersão de poluentes ISC_ST3 (*Software* ISC-AERMOD View 5.8.0, Lakes Environment). Um terceiro local (NO II) foi escolhido como referência, baseado em sua distância em relação à fonte emissora. Estes locais são:

Local NE – Posicionado na segunda direção preferencial dos ventos, a 2,5Km de distância da fonte emissora. Realizada apenas a coleta de MP_{2,5}.

Local NO – Posicionado na primeira direção preferencial dos ventos, a 2,5Km de distância da fonte emissora, em uma escola pública. Realizada a coleta de MP2,5 e biomonitoramento humano.

Local NO II – Posicionado na primeira direção preferencial dos ventos, a 35Km de distância da fonte emissora, próximo a uma escola pública. Área caracterizada com menor incidência de casos de câncer no município (Fepam, 2010). Realizada a coleta de MP10 e biomonitoramento humano.

Os nomes dos locais de coleta referem-se a sua orientação em relação à fonte emissora, NO- Noroeste e NE- Nordeste (Figura 1). Comparativamente a estes locais, foram incluídos dados da literatura (Coronas et al., 2016), obtidos em crianças de uma área afastada 30Km do complexo petroquímico, dentro do município de Triunfo. Estes locais representam um sítio contaminado por preservantes de madeira (Risco), e uma área de referência (Referência).

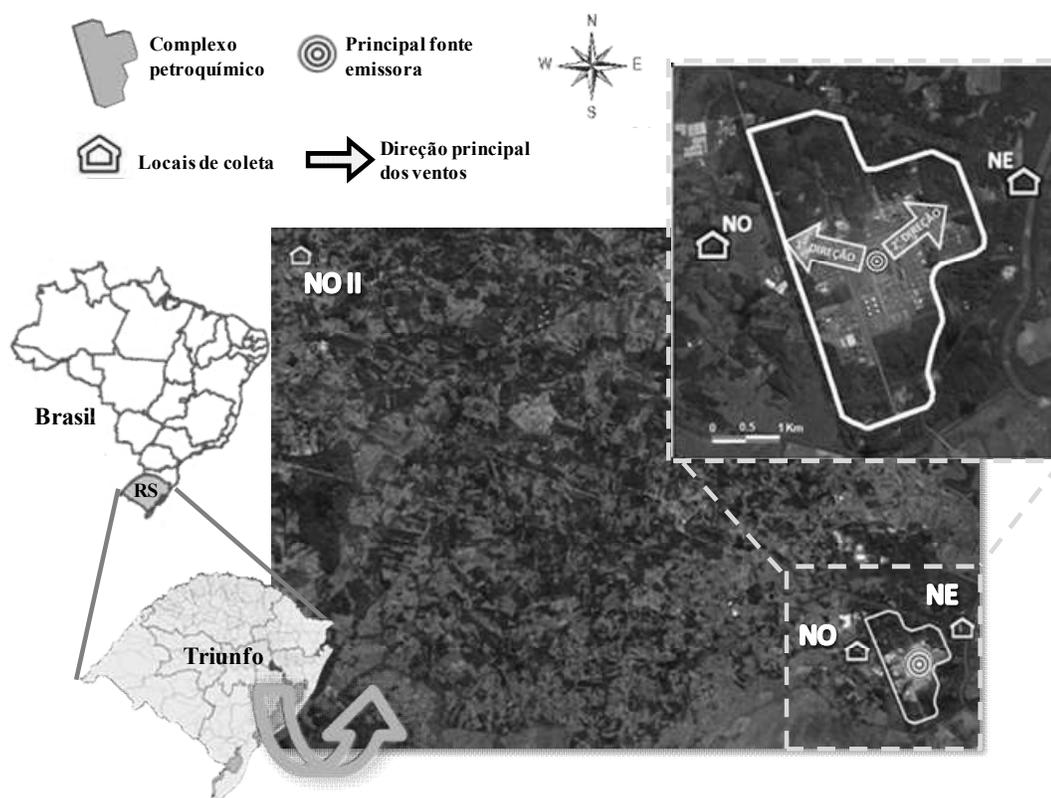


Figura 1 – Área de estudo e locais de amostragem na cidade de Triunfo/RS/Brasil.

2.2. Avaliação ambiental

2.2.1. Coleta do material particulado atmosférico e extração orgânica

Amostradores de grandes volumes de ar (AGV 1200/CCV Thermo Environmental Instruments) foram instalados nos três locais de amostragem. Filtros de membrana de Teflon (TX40HI20WW, 254X203 mm) foram utilizados para a coleta de partículas inaláveis grossas (MP10) no local NO II, e para coleta de partículas inaláveis finas (MP2,5) nos locais NO e NE. As coletas de MP tiveram duração de 24hs e frequência semanal. Os filtros foram pesados e estabilizados em atmosfera controlada (45% de umidade), antes e após as amostragens, para determinar a concentração de partículas, expressa em $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de ar amostrado (ABNT, 1997). Os filtros foram mantidos protegidos da luz, a -20°C , até os procedimentos de extração. Os filtros foram agrupados em amostras I e II, para caracterização geral prévia, e amostras III e IV, realizadas durante o período de avaliação dos biomarcadores humanos.

A extração dos compostos orgânicos foi realizada em um quarto de cada filtro, com solvente diclorometano (DCM, CASRN. 75-09-2), pela técnica de ultrassom (Vargas et al., 1998), permitindo extrair a fração moderadamente polar, onde se encontra a maioria dos compostos orgânicos mutagênicos (Claxton et al., 2004). A massa total obtida na extração foi dividida pelo volume de ar amostrado para obter a matéria orgânica extraída (MOE) em $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Para utilização nos bioensaios, os extratos foram secos com nitrogênio gasoso e ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO, CASRN. 67-68-5).

2.2.2. Análise de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

Os extratos orgânicos de MP correspondentes às amostras III foram utilizados para caracterizar a presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) nos locais estudados, no início do período de coleta dos biomarcadores humanos. A quantificação dos 16 HPAs considerados prioritários pela agência ambiental dos Estados Unidos, USEPA (Acenafteno, Acenaftileno, Antraceno, Benzo(a)antraceno, Benzo(a)pireno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(g,h,i)perileno, Indeno(1,2,3-cd)pireno, Benzo(k)fluoranteno, Criseno, Dibenzo(a,h)antraceno, Fenantreno, Fluorantreno, Fluoreno, Naftaleno e Pireno), foi realizada por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (modelo GC-2010/ QP-2010 Ultra) de acordo com o método EPA 8270D (USEPA, 2014). As condições cromatográficas

foram: temperatura do injetor e da interface de 310°C; temperatura da fonte de íons de 250°C; volume de injeção de 1µl no modo split/splitless; método de ionização: impacto eletrônico (IE) com energia de ionização de 70eV.

2.2.3. Ensaio *Salmonella*/microsoma

A avaliação de mutagenicidade dos extratos orgânicos de material particulado foi realizada pelo ensaio *Salmonella*/microsoma (Maron e Ames, 1983), método de microsusensão (Kado et al. 1983). Foi utilizada a linhagem clássica TA98 (erros no quadro de leitura) em ausência (-S9) e presença (+S9) de fração de metabolização hepática de ratos *Sprague-Dawley* machos (induzidos por Aroclor 1254, Molttox S.A., USA). A presença de compostos mutagênicos nitroderivados foi investigada através de linhagens YG1021 (nitroarenos) e YG1024 (dinitroarenos/aminas aromáticas), (Watanabe, 1989; 1990). Seis concentrações de amostra foram testadas (5,00; 10,00; 15,00; 20,00; 30,00 e 40,00 µg/placa), em duplicatas, em presença de controles negativos (5µl solvente Dimetilsulfóxido – DMSO e 100µl meio nutriente líquido) e positivos (4-nitroquinoleína óxido- 4NQO, 0,5µg/placa, CASRN. 56-57-5; 2 – nitrofluoreno - 2NF, 0,15 µg/placa, CASRN. 607-57-8; e 2- aminofluoreno - 2AF, 1µg/placa, CASRN. 153-78-6 da Sigma Chemical Company, St. Louis, MO).

A mutagenicidade das amostras foi considerada positiva quando esta apresentou ANOVA significativa entre as dosagens e curva dose-resposta positiva ($P \leq 0,05$). A resposta foi considerada indicativa quando observada significância apenas na dose-resposta. As curvas foram analisadas na sua porção linear pelo *Software* Salanal (*Salmonella* Assay Analysis, versão 1.0, Research Triangle Institute, RTP, NC, USA), através dos modelos de regressão linear ou Bernstein (Bernstein et al., 1982). O potencial mutagênico foi estimado pela inclinação da curva de regressão, expresso em número de revertentes por µg de extrato (rev/µg) e revertentes por metro cúbico de ar amostrado ($\text{rev/m}^3 = \text{rev}/\mu\text{g} \times \text{MOE}$).

A sobrevivência celular (TA98) após exposição às amostras foi verificada conforme descrito em Lemos et al., (2016), sendo consideradas citotóxicas, as amostras com crescimento reduzido em 60%.

2.3. Avaliação de biomarcadores genéticos humano

O biomonitoramento genético na população foi realizado em crianças entre 5 e 12 anos de idade, somente nos locais NO e NO II. Uma reunião com representantes das secretarias e vigilância em saúde municipal e estadual, da secretaria de educação municipal e das escolas envolvidas, foi realizada para apresentação dos objetivos do estudo e o estabelecimento de uma rede de colaboradores. As crianças foram selecionadas em duas escolas públicas municipais localizadas na área de estudo. Foram incluídos os escolares que não relataram problemas de saúde e que não se submeteram a exames de raio-X no período da coleta. Foram utilizados como marcadores genéticos o teste do cometa em sangue periférico e teste de micronúcleo em células da mucosa oral e sangue periférico. Este estudo apresenta parecer de aprovação do Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, na forma de adendo ao projeto 07-042 “Estratégias ecotoxicológicas para caracterizar áreas contaminadas como medida de risco à saúde populacional – EcoRisco Saúde”.

2.3.1. Amostragem e coleta de material biológico

Após explanação dos objetivos e procedimentos do estudo, foi solicitado aos pais ou responsáveis das crianças o preenchimento do termo de consentimento informado e de um questionário sobre o histórico de saúde e hábitos da criança. As medidas de peso e altura dos voluntários foram registradas para cálculo do índice de massa corporal (IMC).

A coleta de sangue de cada voluntário foi realizada através de punção intravenosa com agulhas e seringas descartáveis estéreis e adicionados em tubos estéreis contendo heparina. Amostras de células da mucosa oral foram coletadas com escova de polietileno e transferidas para frascos contendo etanol. Os frascos foram mantidos a 4°C até o momento do processamento. As coletas foram realizadas no período entre Outubro e Dezembro/2014.

Os questionários respondidos foram analisados para averiguar possíveis fatores de confusão aos biomarcadores estudados, considerando as seguintes variáveis: idade, IMC, fumo passivo; exposição a raio-X nos últimos 12 meses; uso de medicações nos últimos 12 meses; uso de medicação no dia da coleta; vacinas recebidas nos últimos 12 meses; sexo; relato de doença respiratória pulmonar nos últimos 12 meses; relato de doença respiratória alérgica nos últimos 12 meses; uso de aquecimento à lenha na residência; consumo de carnes, peixes ou vegetais produzidos na área de estudo; local de maior permanência da criança

(dentro ou fora de casa); fumo da mãe durante a gestação e fumo passivo da mãe durante a gestação. A associação entre os biomarcadores e variáveis quantitativas foi averiguada por teste de correlação de Pearson, e entre as variáveis qualitativas por Teste-T ($p < 0,05$). Variáveis com correlação positiva com algum parâmetro também foram analisadas por Análise de Covariância (ANCOVA), para excluir a possível influência das mesmas nos resultados. Nestas análises todos os voluntários foram considerados, independentemente do local de amostragem.

2.3.2. Ensaio do Cometa

A versão alcalina do Ensaio Cometa foi realizada com amostras de sangue periférico total, conforme descrito em Singh et al. (1988), Tice et al. (2000) e Hartmann et al. (2003). As lâminas foram confeccionadas com 5% de sangue periférico em agarose de baixo ponto de fusão, colocadas em solução de lise por 24hs e submetidas à eletroforese de 25V, 300mA, por 20 minutos. Controles negativos (doador externo) e positivos (sangue tratado com 200 μM de H_2O_2) foram incluídos nos testes. As lâminas foram coradas com solução de brometo de etídeo (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e avaliadas em microscópio de fluorescência através do software IV Comet Assay (Perceptive Instruments, Suffolk, UK). Cem nucleóides foram analisados quanto ao percentual de fragmentos de DNA na cauda do cometa (intensidade de cauda).

O parâmetro intensidade de cauda (IC) foi comparado entre os grupos NO e NO II através de Análise de Variância com modelos hierárquicos, no programa computacional SAS (*Proc Mixed - Statistical Analysis System*) versão 9.4, $p < 0,05$. Esta é uma análise de medidas repetidas, que organiza os fatores em níveis dentro de uma ordem específica (células foram consideradas dentro da criança, e esta considerada dentro do grupo) e permite avaliar toda a variação dos danos observados (Lovell e Omori, 2008).

2.3.3. Teste do Micronúcleo em células da mucosa oral e sangue periférico

As amostras de células da mucosa oral foram processadas conforme Thomas et al. (2009), pelo Ensaio do MN em mucosa oral-citoma ("*Bucal MN cytome assay - BMCyt*") com modificações (tampão de mucosa oral substituído por solução de metanol e ácido acético (3:1); etapa de filtração removida). As lâminas resultantes foram coradas empregando o reativo de *Schiff's* e *Fast Green* e analisadas em microscópio com objetiva de alta resolução (1000x). Os métodos e parâmetros considerados foram aqueles descritos por Thomas et al.

(2009): Contagem de 1000 células/indivíduo para determinação das frequências de células binucleadas (Bi), com cromatina condensada (CC); cariorréxica (Crx); picnótica (Pic) e cariolítica (CrI); Contagem de 2000 células diferenciadas/indivíduo considerando o número de micronúcleos (MN) e brotos nucleares (NBUDs) entre elas.

As amostras de sangue periférico foram analisadas pelo Ensaio do MN com bloqueio da citocinese- citoma (CBMN-cyt – “*Cytokinesis block micronucleus cytome assay*”) segundo Fenech (2000; 2007). Estas foram incubadas a 37°C, por 72h, em meio RPMI-1640 suplementado com soro bovino fetal, L-glutamina, penicilina, estreptomicina e fitohemaglutinina. Após 44h do início da cultura, o agente bloqueador da citocinese, citocalasina B, foi adicionado. Os ensaios foram realizados em duplicata, com controles negativo e positivo (Bleomicina, 0,1 mg/mL). As culturas foram centrifugadas e acrescidas de citrato de sódio 1% e formaldeído 0,4%. A fixação do material foi realizada com metanol:ácido acético glacial (3:1) e a coloração com Giemsa 2%. Foram analisadas 2000 células binucleadas por indivíduo, para a presença de micronúcleos, NPBs e NBUDs conforme os critérios de análise de Fenech (2000) e Fenech et al. (2003).

A frequência de micronúcleos e brotos nucleares em células esfoliadas da mucosa oral e de sangue periférico foi avaliada através de Modelos Lineares Generalizados (MLG), com distribuição de Poisson. As demais alterações nucleares existentes nas células de mucosa oral foram avaliadas por MLG, distribuição binomial negativa. As análises foram realizadas utilizando o *software* SPSS, versão 18, $p < 0,05$.

3. Resultados e discussão

3.1. Avaliação ambiental

A concentração de MP2,5 nos filtros amostrados foi similar nos locais NO e NE (Tabela 1), ultrapassando os valores máximos recomendados pela OMS (MP2,5: 25µg/m³; MP10: 50 µg/m³; WHO, 2006) em três ocasiões, sendo duas em NE, e uma em NO. Quanto às concentrações de MP10 avaliadas no local NO II, houve uma amostragem com valor superior a 50µg, limite sugerido por esta agência.

Tabela 1 – Dados dos filtros contendo material particulado coletados a diferentes distâncias de emissões petroquímicas por períodos de 24hs

Local	Amostra	Datas das coletas	C ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	C média ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	MOE ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	
NE	MP2,5	I (Inverno)	10, 16, 22, 28/07/14 03/08/14	38,64; 18,52; 14,27; 11,18; 14,28	19,38 \pm 11,08	0,93
		II (Inverno)	09, 21, 27/08/14 02, 08, 14, 20/09/14	14,41; 25,13; 3,82; 6,78; 9,90; 11,54; 16,62	12,60 \pm 7,02	1,13
		III (Primavera)	26/09/14 02/10/14	15,48; 9,56	12,52 \pm 4,19	1,04
		IV (Primavera)	08/10/14 14/10/14	21,60; 3,68	12,64 \pm 12,67	0,69
NO	MP2,5	I (Inverno)	04, 10, 16, 22, 28/07/14 03/08/14	6,50; 6,02; 17,46; 13,67; 10,42; 13,85	11,32 \pm 4,51	0,68
		II (Inverno)	09, 15, 21, 27/08/14 02, 08, 20/09/14	15,93; 27,84; 23,74; 10,18; 6,17; 11,93; 13,32	15,59 \pm 7,67	1,07
		III (Primavera)	26/09/14 02/10/14	14,04; 5,43	9,73 \pm 6,09	0,68
		IV (Primavera)	08/10/14 14/10/14	23,96; 3,92	13,94 \pm 14,17	2,02
NO II	MP10	I (Inverno)	28/06/14 04, 22, 28/07/14 03/08/14	4,29; 20,56; 27,89; 17,54; 17,55	17,57 \pm 8,54	1,82
		II (Inverno)	15, 21, 27/08/14 08, 20/09/14	52,28; 44,10; 20,59; 19,94; 24,41	32,26 \pm 14,92	2,60
		III (Primavera)	26/09/14 02/10/14	20,33; 15,26	17,74 \pm 3,58	1,83
		IV (Primavera)	08/10/14 14/10/14	36,45; 7,82	22,13 \pm 20,24	3,41

C = concentração de partículas inaláveis (MP10 ou MP2,5) no filtro; MOE = Matéria orgânica extraída. Valor máximo recomendado pela OMS em amostragens de 24hs: MP2,5 = 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; MP10 = 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (WHO, 2006).

Os resultados da análise química dos extratos orgânicos da III coleta mostraram a presença de 14 dos 16 HPAs prioritários segundo USEPA, não sendo encontrado Benzo(a)antraceno e Criseno (Tabela 2). O somatório das concentrações em ng/m^3 das 14 espécies encontradas foi mais elevado nos locais NE e NO II, entretanto uma maior proporção dos oito HPAs (Figura 2), considerados como possíveis, prováveis, ou carcinogênicos para humanos (IARC, 2016), foi observada no local NO. Neste local, 62% dos HPAs encontrados são considerados potencialmente carcinogênicos, contra 16 e 17% nos locais NE e NO, respectivamente (Figura 2). Ainda, a concentração de Benzo(a)pireno foi mais de três vezes superior no particulado do local NO em relação as demais áreas estudadas. Este composto, carcinogênico para humanos (IARC, 2016), é utilizado como marcador do risco carcinogênico dos HPAs. O Brasil não possui legislação específica para este composto, mas a União Européia estabelece a concentração máxima de $1\text{ng}/\text{m}^3$ no material particulado atmosférico ambiente (EEC, 2004). Embora nenhuma amostra tenha atingido este valor para (B[a]P) isoladamente, o risco da exposição à mistura de HPAs não deve ser ignorado.

O quociente de toxicidade equivalente (TEQ) expressa em um único número a potência tóxica dos HPAs relativamente a forma de seu composto mais carcinogênico (B[a]P), sendo obtido pela multiplicação da concentração de cada HPA individual (C_i) no ar por seu respectivo fator de toxicidade (TEF_i) (Bostrom et al., 2002). Em uma mistura de HPAs, o TEQ total ($\Sigma\text{TEQ} = \Sigma C_i \times \text{TEF}_i$) pode ser relacionado com o aumento potencial do risco de câncer (Silva et al., 2010). A caracterização de HPAs no MP do presente estudo, mostrou ΣTEQ cerca de três vezes maior para o local NO (1,86), em relação aos locais NE (0,62) e NOII (0,62).

Maiores percentuais de HPAs de alto peso molecular (5-6 anéis aromáticos) também foram observados no local NO, enquanto no local mais afastado da fonte emissora (NO II) e no local posicionado na segunda direção dos ventos (NE), predominaram HPAs de baixo peso molecular (2-3 anéis). Predomínio de HPAs de alto peso molecular foi reportado em área urbano-industrial no sul do estado, em relação a uma área urbano-residencial em que dominaram os compostos de menor peso molecular (Vargas e Lemos, 2013).

Tabela 2 – Concentrações (ng/m³) de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em partículas atmosféricas

	TEF	Local NE	Local NO	Local NO II
Naftaleno*	0,001 ^a	0,0027	0,0372	0,0813
Acenaftileno	0,001 ^a	0,1008	0,0632	0,0996
Acenafteno	0,001 ^a	0,1084	0,0206	0,1071
Fluoreno	0,001 ^a	0,1790	0,0063	0,1770
Fenantreno	0,001 ^a	1,0155	0,2511	1,0039
Antraceno	0,01 ^a	4,6293	0,0264	4,5762
Fluoranteno	0,001 ^a	0,1567	0,1165	0,1549
Pireno	0,001	0,2174	0,1844	0,2149
Benzo(a)antraceno*	0,1 ^b	0,0000	0,0000	0,0000
Criseno*	0,01 ^b	0,0000	0,0000	0,0000
Benzo(b)fluoranteno*	0,1 ^b	0,7475	0,4597	0,7389
Benzo(k)fluoranteno*	0,1 ^b	0,1118	0,8851	0,1105
Benzo(a)pireno*	1 ^b	0,1012	0,3734	0,1001
Indeno(1,2,3-cd)pireno*	0,1 ^b	0,0000	0,6070	0,0000
Dibenzo(a,h)antraceno*	1 ^b	0,3808	1,2750	0,3765
Benzo(g,h,i)perileno	0,01 ^a	0,7127	1,5236	0,7045
ΣHPAs		8,4638	5,8295	8,4454
TEQ total		0,6232	1,8597	0,6161

TEF = Fator de toxicidade equivalente; valores segundo ^aNisbet e LaGoy (1992) e ^bUSEPA (1993); TEQ = Quociente de toxicidade equivalente. * HPAs considerados com potencial carcinogênico pela IARC.

O uso de razões de diagnóstico (“*diagnostic ratios*”) permite identificar possíveis fontes de HPAs ao se comparar determinadas razões dos compostos quantificados com valores encontrados na literatura ou em estudos de emissão. Este método deve ser usado com precaução pois muitas vezes é difícil distinguir entre algumas fontes (Ravindra et al., 2006) e as concentrações de HPAs podem ser alteradas por processos de degradação atmosféricos (Tobiszewski e Namiesnik, 2012). Harrison et al. (2016) considera haver poucos dados publicados acerca de HPAs em complexos petroquímicos, mas reporta o uso em diferentes estudos da razão entre ANT/(ANT+FEN) <0,1 [Antraceno/(Antraceno+Fenantreno)] como típicas de fontes petrogênicas. O autor ainda relata a consistência dessa razão diagnóstica em seu estudo próximo a um complexo petroquímico. A mesma relação pode ser observada no presente estudo, onde as razões ANT/(ANT+FEN) foram de 0,09 para o local NO, caracterizando sua origem petroquímica, e 0,82 para os locais NE e NO II, possivelmente relacionado a fontes pirogênicas.

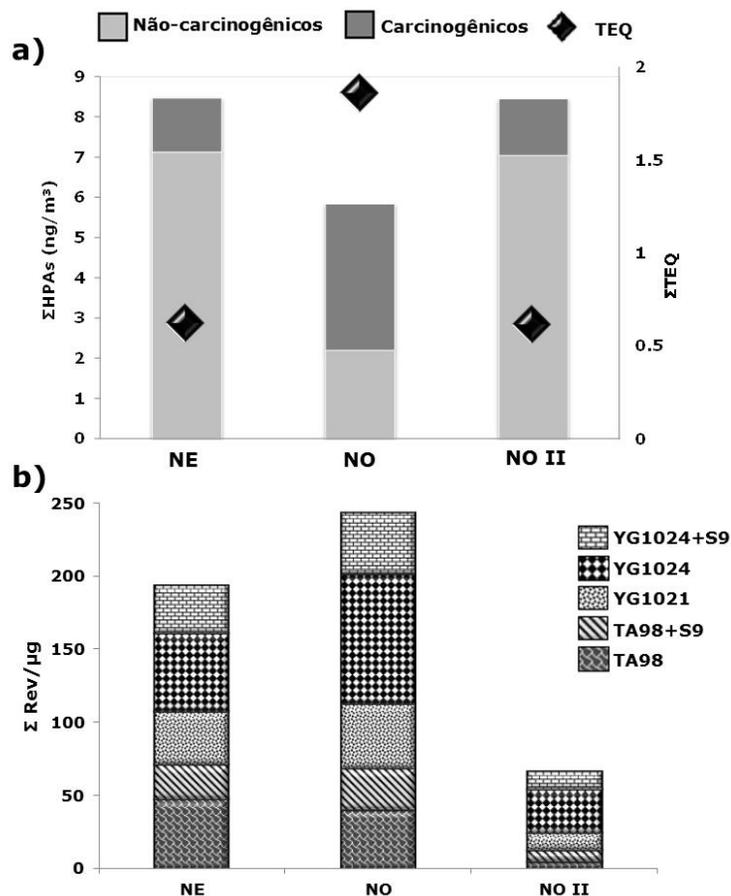


Figura 2 – Somatórios de a) HPAs e b) atividade mutagênica em extratos orgânicos de material particulado atmosférico

HPAs com potencial carcinogênico pela IARC: benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, criseno, indeno(1,2,3-cd)pireno, naftaleno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(a)pireno. HPAs não carcinogênicos: Acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo(ghi)perileno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, e pireno. TEQ = Quociente de toxicidade equivalente.

Já é bem estabelecido, que a exposição ao material particulado atmosférico pode causar danos genotóxicos mesmo quando em baixas concentrações no ambiente (Brito et al., 2013; Kim et al., 2015; Pereira et al., 2010). Tendo em vista a inexistência de um limite seguro de exposição ambiental a este particulado (WHO, 2013), o diagnóstico da qualidade do ar deve ser complementado com o uso de abordagens biológicas. Neste contexto, o ensaio *Salmonella*/microsoma vem se mostrando um biomarcador sensível (Claxton e Woodall, 2007), e foi utilizado em monitoramento prévio na área de estudo (Coronas et al., 2008; Fepam, 2008; Lemos et al., 2016), detectando a possível contribuição das emissões petroquímicas na mutagênese do ar. O ensaio foi igualmente sensível na detecção de

mutagenicidade de áreas urbanas (Brito et al., 2013; Kaffer et al., 2012) e com emissões veiculares (Silva et al., 2015).

A avaliação mutagênica dos extratos orgânicos de MP2,5 e MP10 através do ensaio *Salmonella*/microsoma, mostrou a presença de compostos mutagênicos em todas as amostras avaliadas (Tabela 3). A mutagenicidade, para erro no quadro de leitura, variou de $0,31 \pm 0,10$ a $33,16 \pm 2,35$ rev/ μ g no local NE, de $0,76 \pm 0,22$ a $28,65 \pm 1,55$ rev/ μ g no local NO, e de $0,35 \pm 0,13$ a $3,29 \pm 0,25$ ver/ μ g no local NOII. A metabolização *in vitro* (S9 mix) induziu alterações da mutagenicidade, ocorrendo predomínio de compostos de ação indireta no local NO II, de ação direta no NE e mistura de ambos no NO. A citotoxicidade, caracterizada por sobrevivência celular abaixo de 60%, esteve presente em poucas amostras, ocorrendo com maior frequência no local NO.

Considerando todas as linhagens avaliadas, o local NO II apresentou os menores índices de mutagenicidade em 75% das amostras analisadas (exceto: II em YG1024, III em TA98+S9 e YG1024+S9). O local NO, na primeira direção dos ventos, apresentou 55% de respostas mais elevadas que as verificadas no local NE. Este ponto, na segunda direção dos ventos, induziu respostas mais elevadas em 40% dos ensaios. O somatório total das potências mutagênicas encontradas em todas as linhagens e coletas para os diferentes locais foi $NO > NE > NO II$ (Figura 2b).

Os menores índices de mutagenicidade observados em NO II podem ser explicados, em parte, pelo tipo de particulado coletado nesta área, MP10, que engloba maiores diâmetros de partículas. Geralmente, a mutagenicidade tende a aumentar quanto menor o tamanho das partículas atmosféricas (Pagano et al., 1996; Claxton et al., 2004; Lemos et al., 2012). Entretanto, as características do local avaliado também contribuem para o menor potencial mutagênico encontrado. Isso pode ser confirmado pelos resultados mais elevados verificados por Coronas et al. (2008), em amostras de MP10 dos períodos de inverno e primavera, coletadas a 6,1Km da principal fonte de emissão atmosférica deste complexo petroquímico. O referido ponto, mais próximo do complexo industrial do que o local NO II avaliado no presente estudo, apresentou maiores potências mutagênicas médias para todas as linhagens (TA98 = 5,45; TA98+S9 = 4,01; YG1021=20,57 e YG1024 = 20,20 rev/ μ g).

As potências mutagênicas das amostras de MP2,5 coletadas nos locais mais próximos ao empreendimento industrial, NO e NE (2,5Km de distância), foram geralmente mais elevadas

que as encontradas em uma área neste município utilizada como referência por Coronas et al. (2016). A avaliação genotóxica do MP_{2,5} dos locais NO e NE foi realizada anteriormente, em monitoramento com três ensaios *in vitro* (*Salmonella*, MN e EC em células de pulmão de hamster chinês –V79), por período de um ano (Lemos et al., 2016). Os resultados obtidos nos diferentes biomarcadores foram concordantes em caracterizar o Local NO com pior qualidade, compatível com a maior dispersão de poluentes na primeira direção dos ventos.

A associação das linhagens da família YG, permitiu identificar a ação de compostos nitrogenados em todos os locais. As linhagens YG1021 e YG1024 apresentam alta atividade das enzimas nitroreductase e O-acetiltransferase, conferindo maior sensibilidade à mutagenicidade induzida por nitroarenos e dinitroarenos/aminas aromáticas, respectivamente (Watanabe, 1989; 1990). A contribuição destes compostos na mutagênese observada é verificada ao se comparar os números de revertentes/ μg das linhagens nitro-sensíveis com a linhagem parental (TA98). Os maiores incrementos foram observados no local NO II, atingindo valor 8 vezes superior na YG1024. Embora maior contribuição de nitrocompostos tenha sido observada neste local, as maiores potências mutagênicas relacionadas a essas substâncias foram verificadas no local NO, com até $37,17 \pm 1,57$ rev/ μg na linhagem YG1024. O local NO também apresentou a maior mutagenicidade detectada para mononitroarenos (YG1021: $21,94 \pm 1,14$ rev/ μg) e aminas aromáticas (YG1024+S9: $21,51 \pm 1,22$ rev/ μg).

O monitoramento prévio realizado nestes locais mostrou importante contribuição de nitrocompostos à mutagênese do MP_{2,5} (Lemos et al., 2016). A resposta observada nas linhagens YGs, apresentou incrementos de 43,8 vezes para YG1021 e 106 vezes para YG1024 no local NO, valores marcadamente superiores aos observados em NO II no presente estudo. Esses picos de mutagenicidade atingiram valores de até $1.048,23 \pm 90,28$ rev/ μg (YG1024, Inverno 1, Local NO), sendo possivelmente relacionados com altos índices de NO_x presentes no período avaliado. Ainda, alta potência mutagênica ($127,05 \pm 6,45$ - YG1024, Outono 1, Local NO) foi registrada concomitante a episódio de vazamento de hidrocarbonetos do complexo petroquímico. Esses eventos foram possíveis de serem observados devido ao longo tempo de monitoramento realizado (um ano), fato não ocorrido no presente estudo, que apresenta apenas uma caracterização do MP refletindo as condições do período próximo à avaliação humana. Entretanto, cabe salientar, que os efeitos genotóxicos para as populações expostas podem tornar-se crônicos, e, portanto, ser subestimados em avaliações de menor duração.

Tabela 3 - Mutagenicidade em revertentes/ μg e sobrevivência celular em *Salmonella* de extratos orgânicos de material particulado atmosférico

Local	Amostra	TA98	TA98+S9	YG1021	YG1024	YG1024+S9	Sobrevivência (%)	
							-S9	+S9
NE	I	33,16 \pm 2,35 ^b	13,36 \pm 0,67 ^b	18,88 \pm 0,99 ^b	26,71 \pm 2,51 ^b	14,25 \pm 0,82 ^b	17 ^{Tox}	72
	II	8,04 \pm 0,67	4,70 \pm 0,47	6,43 \pm 0,42	8,33 \pm 0,87 ^b	5,68 \pm 0,47 ^b	76	100
	III	0,42 \pm 0,17 ⁱ	0,31 \pm 0,10	1,98 \pm 0,16	2,85 \pm 0,34 ^b	0,84 \pm 0,16 ^b	90	100
	IV	5,17 \pm 0,34	5,72 \pm 0,50	8,66 \pm 0,38 ^b	16,01 \pm 1,51 ^b	12,37 \pm 0,56	100	100
NO	I	28,65 \pm 1,55 ^b	13,71 \pm 0,65	21,94 \pm 1,14 ^b	37,17 \pm 1,57	21,51 \pm 1,22	28 ^{Tox}	38 ^{Tox}
	II	6,69 \pm 0,47 ^b	10,09 \pm 0,84 ^b	14,64 \pm 0,52	34,94 \pm 1,86 ^b	12,98 \pm 0,94	42 ^{Tox}	84
	III	1,65 \pm 0,23	0,76 \pm 0,22 ^b	2,65 \pm 0,25	1,55 \pm 0,62 ⁱ	1,00 \pm 0,12	100	62
	IV	2,60 \pm 0,23	3,71 \pm 0,21	5,47 \pm 0,32	14,41 \pm 1,01	7,07 \pm 0,50	100	77
NO II	I	1,80 \pm 0,23	3,29 \pm 0,25	4,42 \pm 0,55	14,93 \pm 1,65	5,01 \pm 0,43 ^b	74	63
	II	1,86 \pm 0,42	1,81 \pm 0,23	4,57 \pm 0,48 ^b	11,23 \pm 1,64 ^b	3,36 \pm 0,30	84	61
	III	0,35 \pm 0,13 ⁱ	1,64 \pm 0,46 ^b	0,72 \pm 0,14	1,10 \pm 0,19 ^b	1,59 \pm 0,36 ⁱ	56 ^{Tox}	82
	IV	0,75 \pm 0,24	1,44 \pm 0,19	1,61 \pm 0,19	2,77 \pm 0,20 ^b	2,54 \pm 0,34	66	100

Valores representam média \pm desvio padrão de revertentes por μg de amostras positivas e indicativas de atividade mutagênica. ⁱ respostas indicativas para mutagênese. ^b Modelo Bernstein, demais com modelo linear. Valores em negrito + TOX: presença de citotoxicidade. Controles negativos (DMSO): 37,44 \pm 15,28 (TA98); 37,66 \pm 13,60 (TA98+S9); 67,26 \pm 32,93 (YG1021); 46,36 \pm 30,49 (YG1024); 67,76 \pm 38,53 (YG1024+S9). Controles positivos: 4NQO (TA98) 226,31 \pm 104,25; 2AF (TA98+S9) 186,75 \pm 104,76; 2NF (YG1021) 1156,94 \pm 331,62; 2NF (YG1024) 2298,43 \pm 1076,02; 2AF (YG1024+S9) 757,87 \pm 371,50.

3.2. Biomarcadores genéticos em crianças

Em estudo recente, observamos através de diferentes biomarcadores *in vitro*, maior potencial genotóxico associado ao MP2,5 do local NO, posicionado na primeira direção preferencial dos ventos na região, dentro do principal quadrante de dispersão atmosférica a partir do complexo petroquímico (Lemos et al.; 2016). Pelo fato deste ponto amostral estar situado em uma escola pública, à apenas 2,5Km do empreendimento, a preocupação com a saúde da população exposta se tornou evidente. No presente estudo, buscamos uma segunda escola como local de coleta (NOII), 35 Km de distância do complexo petroquímico mas ainda na direção preferencial dos ventos, como comparativo para a avaliação de genotoxicidade dos escolares. Ainda, utilizamos como referência externa, dados coletados em 2009 no mesmo município, em área localizada a 30 Km do complexo (Coronas et al., 2016).

Um total de 54 crianças participaram do presente estudo, sendo 32 escolares (23 meninas e 9 meninos) do local NO, distante 2,5km da fonte emissora, e 22 escolares (13 meninas e 9 meninos) do local NO II, distante 35Km da fonte emissora. A idade das crianças variou de 5 a 12 anos, sendo a média de $8,35 \pm 1,82$ anos, não havendo diferença significativa nas médias de idade dos dois grupos.

Em alguns casos, os voluntários consentiram em doar apenas amostras de mucosa oral, e em outros, a quantidade de sangue possível de ser coletada foi pequena, fazendo com que haja discrepâncias no tamanho amostral de cada ensaio. A análise de hemograma foi realizada em todas as amostras de sangue coletadas, resultando em parâmetros dentro da normalidade, entretanto, quando pouco volume de sangue foi coletado, priorizou-se a realização do ensaio cometa à avaliação de MN.

Os resultados do Ensaio Cometa mostraram diferenças significativas ($p= 0,0022$) entre os grupos amostrados para o parâmetro intensidade de cauda (Tabela 4). Danos ao DNA significativamente mais elevados foram observados no local mais próximo à fonte de emissão industrial, NO ($10,65 \pm 0,78$) em relação ao local NO II, mais afastado ($6,73 \pm 0,92$). A porcentagem de DNA na cauda do cometa também foi significativamente maior nos escolares deste local do que de crianças morando no entorno de uma área contaminada por preservantes de madeira ($7,05 \pm 0,76$; $p = 0,0206$; Coronas et al., 2016). Crianças residentes em uma cidade com baixa poluição atmosférica apresentaram menores valores de intensidade de cauda

($7,3 \pm 11,66$; Silva et al., 2015) do que os observados no local NO, e similares aos de NO II. A avaliação de crianças saudáveis na Croácia (Gajski et al., 2013), também mostrou percentagens de DNA na cauda pelo ensaio cometa menores que os verificados no presente estudo.

Danos mais elevados no ensaio cometa em crianças residentes (Pelallo-Martínez et al., 2014) e em escolares (Sanchez-Guerra et al., 2012) de áreas petroquímicas foram relacionadas com maiores níveis de exposição a HPAs, confirmados pela análise de metabólitos na urina.

No ensaio CBMN-Cyt, a frequência de micronúcleos em sangue periférico não diferiu entre os grupos avaliados NO e NO II (Tabela 4). A ocorrência de brotos nucleares foi significativamente mais elevada ($p < 0,0001$) no local NO II. Entretanto, devido ao pequeno número amostral obtido em NO II, as diferenças entre os locais devem ser vistas com cautela. A formação dos NBUDs pode estar relacionada com a eliminação de ampliações do DNA ou de complexos de reparo do DNA (Fenech et al., 2003). As frequências de NPBs foram de $1,59 \pm 0,25$ nas crianças de NO e $1,00 \pm 0,41$ nas de NOII não apresentando diferença significativa. Segundo Fenech (2007), vários mecanismos podem levar à formação de pontes nucleoplásmicas devido a ocorrência de cromossomos dicentricos resultantes de erros no reparo de quebras de fitas duplas do DNA ou fusão de telômeros.

Os dados obtidos por Coronas et al. (2016), em crianças moradoras no entorno de uma área de solo contaminado por preservantes de madeira, considerando a dispersão atmosférica dos poluentes, permitiu comparações com o estudo atual, em população similar no mesmo município (Tabela 4). Ambos locais (NO e NO II) apresentaram frequências de MN estatisticamente maiores ($p = 0,0017$ e $p = 0,0005$, respectivamente), do que o grupo controle avaliado no referido estudo. Crianças da área próxima a este sítio contaminado (Risco), também apresentaram menores índices de MN ($p < 0,0001$) do que as crianças do local NO. Estes resultados sugerem maior potencial genotóxico das áreas com influência petroquímica. Em revisão recente sobre o uso do ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese para biomonitoramento humano, Sram et al. (2016), concluem que este é um sensível biomarcador de exposição à HPAs. O resultado verificado nos escolares do local NO, foram similares aos encontrados em crianças de áreas rurais da Índia ($1,7 \pm 0,3$), semi-rurais da Bélgica ($2,94 \pm 0,43$), conforme revisão de Neri et al. (2006) e áreas urbanas e rurais da Dinamarca ($2,03 \pm 1,47$), segundo Morck et al. (2016). Comparando ainda, com resultados de diferentes áreas

com poluição atmosférica (Neri et al., 2006; Pedersen et al., 2006), e avaliação de níveis basais de MN (Gajski et al., 2013), os resultados obtidos em NO são menores.

Foi determinada a frequência de MN em células mononucleadas (MONO) sendo de $1,18 \pm 0,90$ nos escolares de NO e $2,08 \pm 0,53$ nos de NOII. Estes resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa. O registro de MN em células MONO, proposto por Kirsch-Volders e Fenech (2001), baseia-se no fato de que os linfócitos podem já conter micronúcleos originados em divisão celular *in vivo*, presentes na célula antes da realização da cultura com Cyt-B. Em células binucleadas os MN são expressos durante a cultura, como resultado de quebras cromossômicas acumuladas durante a fase G_0 *in vivo*. A adição da contagem de MN em células MONO à contagem em células BI deve prover uma análise mais ampla, assegurando que todos os eventos de danos ao DNA expressos em MN sejam registrados. Verificou-se correlação positiva ($r = 0,35$; $p = 0,035$) entre as frequências de MN em células binucleadas e mononucleadas, como observado por Fenech et al (2016), justificando a adequabilidade do ensaio CBMN-Cyt na avaliação de exposição crônica à agentes genotóxicos.

Tabela 4. Biomarcadores de genotoxicidade em amostras de sangue periférico total de escolares expostos à poluição atmosférica

Amostra	Biomarcador	Este estudo				Coronas et al. (2016)			
		Local NO		Local NO II		Referência		Risco	
		Média ± SE	n	Média ± SE	n	Média ± SE	n	Média ± SE	n
Sangue Periférico	Ensaio cometa:		28		20		20		42
	Intensidade de Cauda	10,65 ± 0,78 ^{a,b}		6,73 ± 0,92 ^a		7,20±3,15		7,10±2,16 ^b	
	Teste de Micronúcleos:		28		8		17		41
	MN	1,66 ± 0,17 ^{c, d}		1,81 ± 0,34 ^c		0,41±0,08 ^{c,e}		0,93±0,09 ^d	
	NBUDs	0,68 ± 0,11 ^f		2,31 ± 0,38 ^f		-		-	
	NPBs	1,59±1,32		1,00±1,45		-		-	

n= número de crianças avaliadas; MN= micronúcleos; NBUDs = brotos nucleares; NPBs= pontes nucleoplásmicas. Frequência de células com MN, NBUDs e NPBs em 1000 células. Letras iguais indicam diferença significativa no teste estatístico: ^adiferença significativa p=0,002; ^bdiferença significativa p=0,02; ^cdiferença significativa p=0,002; ^ddiferença significativa p<0,0001; ^ediferença significativa p=0,0005; ^fdiferença significativa p=0,0001

O presente estudo empregou o Ensaio de micronúcleo em mucosa oral (BMCyt) que utiliza marcadores de danos ao DNA, instabilidade cromossômica e morte celular (Thomas et al., 2009). O epitélio oral é considerado um alvo importante para toxinas inaladas, uma vez que estas células estão em contato constante com o ambiente. Os resultados para danos ao DNA e alterações nucleares nas células de mucosa oral estão apresentados na Tabela 5. Não houve diferença entre os grupos quanto à frequência de MNs e NBUDs. A média de MN encontradas nos escolares do Local NO ($0,31 \pm 0,13\%$) e NO II ($0,17 \pm 0,07\%$) foi semelhante às encontradas previamente em crianças nesse município ($0,16 \pm 0,05\%$ referência e $0,14 \pm 0,04\%$ risco), crianças residentes em cidade com baixa poluição atmosférica no sul do Brasil ($0,3 \pm 0,41\%$ Silva et al., 2015), escolares de uma área de referência na Amazônia brasileira ($0,29 \pm 0,41\%$; Sisenando et al., 2012) e de cidade com baixo nível de poluição atmosférica na Itália ($0,28\%$; De dono et al., 2016). De acordo com Bonassi et al. (2011), a frequência de MN espontânea em células da mucosa oral, fica em torno de $0,74\%$ na população em geral, variando de $0,3$ a $1,7\%$. Estudos em crianças de áreas urbanas (Cereti et al., 2014; Fleck et al., 2014) e expostas a pesticidas (Bernardi et al., 2015; Castañeda-Yslas et al., 2016), mostraram a sensibilidade deste biomarcador na avaliação de exposição ambiental.

Tabela 5. Biomarcadores de genotoxicidade em amostras de mucosa oral de escolares expostos à poluição atmosférica

Amostra	Biomarcador	Local NO		Local NO II	
		Média \pm SE	n	Média \pm SE	n
Teste de Micronúcleos:			29		21
Danos ao DNA/1000 céls					
	MN	$0,31 \pm 0,13$		$0,17 \pm 0,07$	
	NBUD	$0,45 \pm 0,12$		$0,59 \pm 0,18$	
Mucosa Oral	Alterações nucleares /1000 céls				
	BN	$1,10 \pm 0,28$		$1,09 \pm 0,33$	
	Pic	$3,48 \pm 0,73$		$4,28 \pm 1,04$	
	CC	$175,07 \pm 32,60$		$187,24 \pm 40,97$	
	Crx	$24,79 \pm 4,69^a$		$68,95 \pm 15,15^a$	
	Crl	$5,10 \pm 1,04^b$		$17,67 \pm 3,96^b$	

MN- micronúcleos; NBUDs- brotos nucleares; BN-células binucleadas; Pic- célula picnótica; CC- célula com cromatina condensada; Crx- célula cariorrética; Crl- célula cariolítica. Letras iguais indicam diferença significativa entre locais no teste estatístico: ^aDiferença significativa $p=0,0004$; ^bDiferença significativa $p<0,0001$.

Segundo Ceppi et al. (2010), a ocorrência de MN em células da mucosa oral ocorre em frequências mais baixas do que em linfócitos de sangue periférico, entretanto há correlação significativa entre o incremento de células micronucleadas nos dois tecidos, apoiando a hipótese de que eventos genotóxicos similares podem estar causando a formação de MNs em ambos os tecidos *in vivo* e *ex vivo*, respectivamente. Em contraste às respostas positivas obtidas pelos biomarcadores em sangue periférico, no presente estudo a avaliação da mucosa oral não detectou o potencial genotóxico dos poluentes da área. Além disso, não houve correlação entre os marcadores de danos ao DNA dos dois tecidos.

Em relação às alterações nucleares, as frequências de células cariorréticas e cariolíticas foram significativamente mais elevadas no local mais afastado da fonte emissora (NOII). Estes marcadores estão associados a eventos de morte celular por apoptose ou necrose (Thomas et., 2009). Embora não seja comprovado, células cariorréticas podem estar relacionadas a estágios tardios da apoptose, que é controlada geneticamente, sendo sua frequência espontânea, na população em geral, estimada em $2.23 \pm 0,25\%$ (Bonassi et al., 2011), valor bem inferior ao encontrado nas duas áreas de estudo. Esta anormalidade nuclear foi significativamente aumentada em indivíduos expostos a pesticidas (Bonassi et al., 2011, Da Silva et al., 2012). As células cariolíticas representam os últimos estágios no processo de morte celular (Thomas et al., 2009). As anormalidades nucleares associadas ao processo de morte celular (cromatina condensada, cariorrétis, picnose e cariólise), são intrínsecas ao epitélio escamoso, particularmente devido a efeitos crônicos da mastigação sobre a mucosa oral e a constante ação de agentes mutagênicos aumenta a frequência dessas anormalidades (Ramirez e Saldanha, 2002).

No presente estudo verificaram-se correlações positivas (CrX X CC; Picn X Crx; CrI X Bi) e negativas (CC X Bi; CC X CrI) entre diferentes marcadores de morte celular (Tabela S1-material suplementar), que podem indicar os diferentes estágios do processo de apoptose, embora os mecanismos de formação dessas anomalias ainda não sejam bem compreendidos.

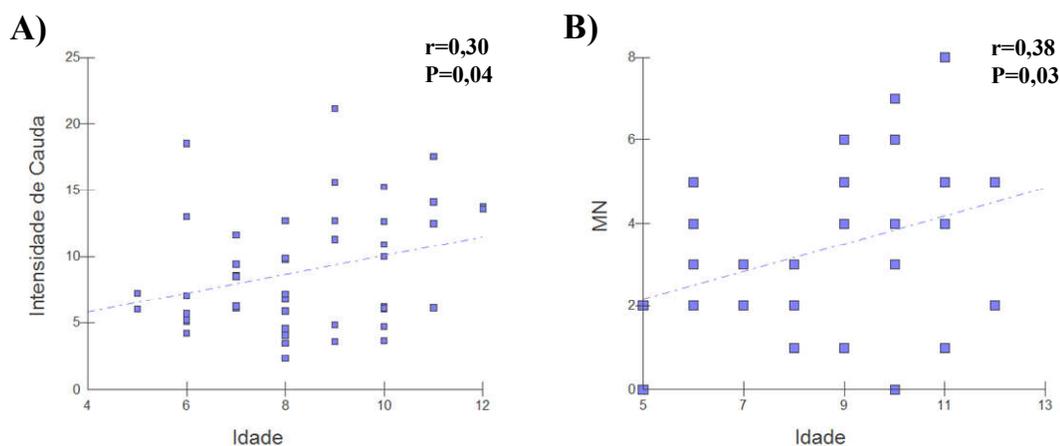
Houve correlação positiva entre as células com danos ao DNA, MN e NBUD ($r= 0,43$; $p= 0,002$), e de ambas com alterações nucleares representativas de defeitos na citocinese (binucleadas, $r= 0,41$ e $r= 0,44$; $p= 0,003$ e $p= 0,02$ – respectivamente). Células com NBUDs ainda foram positivamente correlacionadas com células picnóticas ($r= 0,35$; $p= 0,013$) e cariolíticas ($r= 0,60$; $p< 0,0001$). Tolbert et al. (1991) sugeriu que a apoptose age como um

mecanismo de controle eliminando as células com danos genéticos. Então, a apoptose em excesso pode servir como um indicador de insulto genotóxico. Da silva et al. (2012), sugere que o aumento da morte celular por apoptose causou o decréscimo de células micronucleadas em trabalhadores ligados a colheita de folhas de fumo. De forma similar, em nosso estudo, a frequência de células com cromatina condensada foi negativamente correlacionada com células micronucleadas ($r = -0,48$; $p < 0,0001$) e NBUDs ($r = -0,31$; $p = 0,03$). Estas células podem estar sofrendo fragmentação devido aos primeiros estágios da apoptose levando a eventual desintegração (Thomas et al., 2009). A alta ocorrência deste biomarcador de morte celular em escolares dos dois locais (NO e NO II), pode ser a causa da não detecção de dano genético neste ensaio (BMCyt).

Os biomarcadores intensidade de cauda e frequência de micronúcleos no ensaio CBMN-cyt apresentaram correlação positiva com a idade ($r = 0,30$; $p = 0,04$ e $r = 0,38$; $p = 0,03$, respectivamente – Figura S1) como observado anteriormente em outros trabalhos com crianças e adultos (Fenech e Bonassi, 2011; Moller, 2006; Pedersen et al., 2006). As médias de idade não diferiram entre os grupos estudados, não sendo a causa das diferenças encontradas para estes biomarcadores. O índice de massa corporal também apresentou correlação positiva ($r = 0,32$; $p = 0,03$) com o parâmetro intensidade de cauda (IC), contudo não houve diferença entre os grupos. De acordo com a faixa etária e sexo, 58% dos escolares apresentavam IMC considerado normal para crianças brasileiras (Conde e Monteiro, 2006), 24% estavam com excesso de peso e 17% apresentavam obesidade. Crianças com obesidade possuem taxas respiratórias elevadas causando maior deposição de partículas finas nos pulmões, assim, aquelas com alto IMC podem ser mais suscetíveis aos efeitos da poluição atmosférica (Bennett e Zeman, 2004; Salvi, 2007). Entretanto, avaliando o efeito do IMC separadamente por faixa etária e por estado nutricional (normal, excesso de peso e obesidade), a correlação com o parâmetro intensidade de cauda deixou de ser significativa em todas as análises. Isso sugere, que a correlação IMC x IC está refletindo a relação desse parâmetro com a idade (crianças mais velhas possuem maior IMC), e não com o estado nutricional das mesmas.

Não houve correlação entre os parâmetros intensidade de cauda e frequência de MN no ensaio CBMN-Cyt. Este resultado é similar ao verificado por Coronas et al. (2016), em estudo com crianças desta região.

Figura S1 – Correlações entre os biomarcadores em sangue periférico, A) intensidade de cauda e B) frequência de micronúcleos, com a idade de escolares expostos à poluição atmosférica



A análise dos dados levantados nos questionários sobre histórico de saúde e hábitos dos voluntários permitiu detectar possíveis fatores de confusão nas respostas genotóxicas encontradas. Nas crianças com relatos de alergias respiratórias foram observados maiores danos primários no DNA ($IC = 10,95 \pm 1,07$) do que em crianças sem este quadro ($IC = 8,08 \pm 0,71$). Verificou-se que o maior número desses relatos ocorreu no local NO, correspondendo a 40% dos voluntários, enquanto que em NOII esta proporção foi de 18%. Evidências epidemiológicas e laboratoriais indicam que muitos poluentes do ar são capazes de induzir inflamação ou hiper-sensibilidade das vias áreas e indicam maior incidência de alergias respiratórias em locais poluídos (D'Amato, 2002)

Os demais fatores de confusão avaliados não influenciaram nas respostas dos múltiplos biomarcadores analisados. Apesar de vários estudos relacionarem o fumo passivo como indutor de danos ao DNA e fator de confusão no biomonitoramento genético de agentes ambientais, esta variável não mostrou influência nos resultados do presente estudo.

Tabela S1 – Correlações entre alterações nucleares e danos ao DNA em células de mucosa oral

	Correlação	Binucleada	Cromatina Condensada	Cariorréxica	Picnótica	Cariolítica	MN	NBUD
Binucleada	Pearson	1	-0,50*	-0,27	0,19	0,50*	0,41*	0,43*
	Significância		0,0001	0,06	0,18	0,0001	0,003	0,002
Cromatina Condensada	Pearson		1	0,33*	0,04	-0,42*	-0,48*	-0,31*
	Significância			0,02	0,81	0,002	0,0001	0,03
Cariorréxica	Pearson			1	0,38*	-0,42	-0,16	0,13
	Significância				0,007	0,77	0,28	0,36
Picnótica	Pearson				1	0,18	0,27	0,35*
	Significância					0,21	0,06	0,01
Cariolítica	Pearson					1	0,24	0,60*
	Significância						0,09	0,0001
MN	Pearson						1	0,43*
	Significância							0,002
NBUD	Pearson							1
	Significância							

*negrito indica correlação com significância (p<0,05). MN=Micronúcleos, NBUDs = brotos nucleares.

4. Conclusões

A vigilância da exposição humana a contaminantes ambientais tem sido considerada uma das prioridades em programas de saúde pública. Assim são relevantes estudos populacionais que busquem definir marcadores de efeitos precoces desses agentes na qualidade de vida e na saúde humana. Embora as crianças sejam mais suscetíveis a contaminantes ambientais do que os adultos, poucos estudos vêm sendo realizados avaliando os efeitos de poluentes atmosféricos através de biomarcadores de genotoxicidade nessa faixa etária. Este estudo associou a avaliação de biomarcadores de genotoxicidade em amostras de sangue periférico e de mucosa oral de escolares de áreas próximas a um complexo industrial petroquímico, à caracterização química e mutagênica das partículas atmosféricas locais.

O local NO, situado na primeira direção dos ventos e mais próximo ao complexo petroquímico, apresentou pior qualidade do ar, evidenciada por respostas mutagênicas mais elevadas e perfil de HPAs mais tóxico (Σ TEQ) no material particulado. Os escolares desse local apresentaram maior dano primário ao DNA no ensaio cometa. Também apresentaram maior indução de quebra ou perda cromossômica (MN), comparativamente ao estudo realizado nesse município, em área de risco contaminada por preservantes de madeira, e seu local-referência.

Em NO II, mais distante da fonte emissora (35Km), os valores de MN encontrados também foram maiores que os da área de referência citada anteriormente (Coronas et al., 2016) e localizada a aproximadamente 20Km. Aliada a esta observação, a maior frequência de brotos nucleares verificada nos escolares de NO II relativamente à NO, sugere que este local também se encontra sob influência de poluentes, embora com perfil diferente do encontrado em NO. A composição de HPAs verificadas nesse ponto e o perfil de mutagênese, também diferem corroborando essa hipótese (Figura 2).

Os ensaios realizados em sangue periférico, EC e CBMN-cyt mostraram ser mais adequados para identificar efeitos causados por poluentes atmosféricos relativamente ao ensaio do micronúcleo em mucosa oral, apesar da maior facilidade de obtenção destas células. O sangue periférico é uma matriz ideal para estudo da maioria das substâncias químicas porque está em contato com todos os tecidos do corpo, sendo sua principal desvantagem a natureza invasiva da coleta que afeta a adesão de voluntários. No monitoramento ambiental,

potências mutagênicas mais elevadas foram observadas na amostra com maior Σ TEQ, reforçando a adequabilidade do ensaio *Salmonella*/microsoma em diagnósticos genotóxicos. Esta metodologia se mostrou sensível na determinação de efeitos mutagênicos dos poluentes atmosféricos, mesmo em amostras enquadradas dentro dos padrões de qualidade do ar.

A identificação de efeitos genotóxicos do material particulado atmosférico inalável por biomarcadores de mutagenicidade aliado ao biomonitoramento humano, permitiu evidenciar que as crianças avaliadas estão expostas a uma mistura de contaminantes de diferentes fontes, sendo a proximidade da indústria petroquímica um contribuinte aos fatores de risco. Os padrões de controle da qualidade ambiental não são suficientes para garantir a saúde das populações expostas. Medidas são necessárias para identificar e reduzir emissões e efeitos perigosos.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos voluntários e seus responsáveis, às equipes das escolas participantes do estudo e aos técnicos de amostragem da FEPAM. Somos gratos pelo auxílio dos estudantes Andressa Negreiros Flores, Caroline Barros e Paula Ribas Neves. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que também concedeu bolsa de doutorado à Andréia Torres de Lemos.

5. Referências bibliográficas

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1997. ABNT-NBR-9547: Material particulado em suspensão no ar ambiente - Determinação de concentração total pelo método do amostrador de grande volume. Rio de Janeiro. 14p
- Araldi, R.P., Melo, T.C., Mendes, T.B, De Sá, P. J.; Nozima, B.H.N.; Ito, E.T., Carvalho, R.F., Souza, E.B., Stocco, R.C., 2015. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomed Pharmacother.* 72, 74-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2015.04.004>
- Bennett, W.D., Zeman, K.L., 2004. Effect of body size on breathing pattern and fine-particle deposition in children. *J Appl Physiol* .97, 821–826
- Bernardi, N., Gentile, N., Mañas, F., Méndez, Á1., Gorla, N., Aiassa, D., 2015. Assessment of the level of damage to the genetic material of children exposed to pesticides in the province of Córdoba. *Arch Argent Pediatr.* 113(2), 126-31. doi: 10.1590/S0325-00752015000200009.
- Bernstein, L., Kaldor, J., McCann, J., Pike, M.C., 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat. Res.* 97, 267–281.
- Bonassi, S., Coskun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S., Holland, N., Kirsh-Volders, M., Knasmueller, S., Zeiger, E., Carnesoltas, D., Cavallo, D., Silva, J., Andrade, V.M., Demircigil, G.C., Odio, A.D., Donmez-Altuntas, H., Gattas, G., Giri, A., Giri, S., Gómez-Meda, B., Gómez-Arroyo, S., Hadjidekova, V., Haveric, A., Kamboj, M., Kurteshi, K., Martino-Roth, M.G., Montoya, R.M., Nersesyanyan, A., Pastor-Benito, S., Salvadori, D.M.F., Shaposhnikova, A., Stopper, H., Thomas, P., Torres-Bugarín, O., Yadav, A.S., González, G.Z., Fenech, M., 2011. The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res* 728, 88–97. doi:10.1016/j.mrrev.2011.06.005
- Boström, C.E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernström, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Rannug, A., Törnqvist, M., Victorin, K., Westerholm, R., 2002. Cancer risk assessment,

- indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspect.* 110, 451-88.
- 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_{2.5}) using *Salmonella*, plants and mammalian cells. *Ecotox Environ Safe* 94, 14–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.04.014>.
- Castañeda-Yslas, I.J., Arellano-García, M.E., García-Zarate, M.A., Ruíz-Ruíz, B., Zavala-Cerna, M.G., Torres-Bugarín, O., 2016. Biomonitoring with Micronuclei Test in Buccal Cells of Female Farmers and Children Exposed to Pesticides of Maneadero Agricultural Valley, Baja California, Mexico. *Journal of Toxicology.* 2016, 8 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7934257>
- Ceppi, M., Biasotti, B., Fenech, M., Bonassi, S., 2010. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. *Mutat Res.* 705, 11–19.
- Ceretti, E., Feretti, D., Viola, G.C., Zerbini, I., Limina, R.M., Zani, C., Capelli, M., Lamera, R., Donato, F., Gelatti, U., 2014. DNA damage in buccal mucosa cells of pre-school children exposed to high levels of urban air pollutants. *PLoS One.* 2;9(5):e96524. doi: 10.1371/journal.pone.0096524
- 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.
- Collins, A., Koppen, G., Valdiglesias, V., Dusinska, M., Kruszewski, M., Møller, P., Rojas, E., Dhawan, Al., Benzie, I., Coskun, E., Moretti, M., Speit, G., Bonassi, S., 2014. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. *Mutat Res.* 759, 27–39.
- Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Stetina, R., 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis.* 23, 143–151.

- Conde, W.L., Monteiro, C.A., 2006. Body mass index cutoff points for evaluation of nutritional status in Brazilian children and adolescents. *J Pediatr.* 82, 266-72. doi:10.2223/JPED.1502
- 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.
- Da Silva, F.R., Silva, J., Nunes, E., Benedetti, D., Kahl, V., Rohr, P., Abreu, M. B., Thiesen, F.V., Kvitko, K., 2012. Application of the buccal micronucleus cytome assay and analysis of PON1Gln192Arg and CYP2A6*9 (-48T>G) polymorphisms in tobacco farmers. *Environmental Molecular Mutagenesis.* 53, 525–534.
- D'Amato, G., 2002. Environmental urban factors (air pollution and allergens) and the rising trends in allergic respiratory diseases. *Allergy.* 72, 30-3.
- De Donno, A., Grassi, T., Ceretti, E., Viola, G.C.V., Levorato, S., Vannini, S., Salvatori, T., Carducci, A., Verani, M., Bonetta, SA., Carraro, E., Bonizzoni, S., Bonetti, A., Bagordo, F., Serio, F., Idolo, A., Gelatti, U., MAPEC_life study group. 2016. Air pollution biological effects in children Living in lecce (Italy) by buccal micronucleus Cytome assay (the MAPEC_life study). *Int. J. Sus. Dev. Plann.* 11 (4), 500–510. DOI: 10.2495/SDP-V11-N4-500-510
- EEC (European Commission), 2004. Directiva 2004/107/CE do Parlamento Europeu e do Conselho relativa ao arsênio, ao cádmio, ao mercúrio, ao níquel e aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no ar ambiente. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 23/3.

- Englert, N., 2004. Fine particles and human health-a review of epidemiological studies. *Toxicol Lett.* 149, 235–242.
- Fenech, M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols.* 2 (5), 1084- 1104. doi:10.1038/nprot.2007.77
- Fenech, M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455 81–95.
- Fenech, M., Bonassi, S., 2011. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 26, 43–49.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E., 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 534, 65–75
- Fenech, M., Holland, N., Zeiger, E., Chang, W.P., Burgaz, S., Thomas, P., Bolognesi, C., Knasmueller, S., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., 2011. International collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells—past, present and future. *Mutagenesis.* 26, 239-245. doi: 10.1093/mutage/geq051
- Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Bonassi, S., Holland, N., Migliore, L., Palitti, F., Natarajan, A.T., Kirsch-Volders, M. 2016. Molecular mechanisms by which *in vivo* exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes *in vivo* and *ex vivo* in humans. *Mutat Res* 770, 12–25.
- FEPAM- Fundação Estadual de Proteção Ambiental, 2008. Estratégias ecotoxicológicas para avaliação de risco aplicadas a bacia hidrográfica do Rio Caí: Atlas ambiental. Porto Alegre, 164p.
- Fepam, 2010. Relatório final do projeto “Estratégias ecotoxicológicas para caracterizar áreas contaminadas como medidas de risco à saúde populacional – EcoRisco Saúde”. Porto Alegre, Brasil.
- Fleck, A.S., Vieira, M., Amantéa, S.L., Rhoden, C.R., 2014. A Comparison of the Human Buccal Cell Assay and the Pollen Abortion Assay in Assessing Genotoxicity in an

- Urban-Rural Gradient. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 11, 8825-8838.
doi:10.3390/ijerph110908825
- Gajski, G., Geric, M., Canin, V.O., Garaj-Vrhovac, V., 2013. Cytogenetic status of healthy children assessed with the alkaline comet assay and the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutat Res.* 750, 55–62.
- Gallo, V., Egger, M., McCormack, V., Farmer, P.B., Ioannidis, J.P.A, Kirsch-Volders, M., Matullo, G., Phillips, D.H., Schoket, B., Stromberg, U., Vermeulen, R., Wild, C., Porta, M., Vineis, P., 2011. STrengthening the Reporting of OBServational studies in Epidemiology – Molecular Epidemiology (STROBEME): An Extension of the STROBE Statement. *J Clin Epidemiol.* 64, 1350-1363.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclinepi.2011.07.010>
- Harrison, R.M., Alam, M.S., Dang, J., Basahi, J., Alghamdi, M.A., Ismail, I.M., Khoder, M., Hassan, I.A. 2016. Influence of petrochemical installations upon PAH concentrations at sites in Western Saudi Arabia. *Atmospheric Pollution Research* 7, 954-960.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.apr.2016.05.012>
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R., 4th International Comet Assay Workshop. 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*. 18(1), 45-51.
- IARC - International Agency for Research on Cancer, 2015. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks of chemicals to humans: outdoor air. 109, Lyon, France.
- IARC - International Agency for Research on Cancer, 2016. Agents Classified by the IARC Monographs. Volumes 1–117. Online. Disponível em:
http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php
- Kado, N.Y., Langley, D., Eisenstadt, E., 1983. A simple modification on the *Salmonella* liquid-incubation assay: increase sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat. Res.* 121, 25-33.

- Kado, N.Y., Langley, D., Eisenstadt, E., 1983. A simple modification on the *Salmonella* liquid-incubation assay: increase sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat. Res.* 121, 25-33.
- 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.
- Kim, K.H., Kabir, E., Kabir, S., 2015. A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environ Int* 74, 136–143.
- Kirsch-Volders, M., Fenech, M., 2001. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis-block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis* 19,51–58.
- 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.2016.05.087. Epub 2016 Jun 22.
- Lemos, A.T., Lemos, C.T., Negreiros, A.O, Pantoja, E.O., Rocha, J.A.V., Vargas, V.M.F., 2016. Genotoxicity biomarkers for Airborne Particulate Matter (PM2.5) in an area under petrochemical influence. *Chemosphere.* 159, 610-618.
- Lemos, A.T., Vargas, V.M.F., 2013. Genotoxicity of airborne particulate matter as a tool to prevent the effects of environmental pollution on health. In: Shubham Manchanda. (Org.). *Air Pollution: Sources, Prevention and Health Effects*. 1ed. New York: Nova Science Publishers, v. 1, p. 65-84.
- Lovell, D.P., Omori, T., 2008. Review: statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis.* 23, 171–182. DOI: 10.1093/mutage/gen015

- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113, 173-215.
- Mills, N.L., Donaldson, K., Hadoke, P.W., Boon, N.A., MacNee, W., Cassee, F.R., Sandström, T., Blomberg, A., Newby, D.E., 2009. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 6, 36 – 44. doi:10.1038/ncpcardio1399
- Møller, P., 2006. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat Res* 612, 84–104.
- Morakinyo, O.M., Mokgobu, M.I., Mukhola, M.S., Hunter, R.P., 2016. Health Outcomes of Exposure to Biological and Chemical Components of Inhalable and Respirable Particulate Matter. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 13, 592. doi:10.3390/ijerph13060592
- Mørck, T.A., Looock, K.V., Poulsen, M.B., Siersma, V.D., Nielsen, J.K., Hertel, O., Kirsch-Volders, M., Knudsen, L.E., 2016. Micronucleus frequency in Danish schoolchildren and their mothers from the DEMOCOPHES population. *Mutagenesis*. 31(1),1-8. doi: 10.1093/mutage/gev054. Epub 2015 Jul 17.
- Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455, 29-60.
- Neri, M., Ugolini, D., Bonassi, S., Fucic, A., Holland, N., Knudsen, L. E., Sram, R.J., Ceppi, M., Bocchini, V., Merlo, D.F., 2006. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage II: Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutat. Res.* 612, 14-39.
- Neri, M., Ugolini, D., Bonassi, S., Fucic, A., Holland, N., Knudsen, L.E., Sram, R.J., Ceppi, M., Bocchini, Vi., Merlo, D.F., 2006. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutat Res* 612 , 14-39.
- Nisbet, I.C., LaGoy, P.K., 1992. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regul Toxicol Pharmacol.* 16(3), 290-300.

- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. 2016. OECD guideline for the testing of chemicals, Test No. 489: *In Vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay. OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264224179-en>
- Pagano, P., Zaiacomo, T., Scaecella, E., Bruni, S., Calamosca, M., 1996. Mutagenic activity of total and particle-sized fractions of urban particulate matter. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3512–3516.
- Pedersen, M., Vinzents, P., Petersen, J.H., Kleijnans, J.C.S., Plas, G., Kirsch-Volders, M., Dostál, M., Rossner, P., Beskid, O., Sram R.J., Merlo, D.F., Knudsen, L.E., 2006. Cytogenetic effects in children and mothers exposed to air pollution assessed by the frequency of micronuclei and fluorescence in situ hybridization (FISH): A family pilot study in the Czech Republic. *Mutat. Res.* 608, 112–120.
- Pelallo-Martínez, N.A., Batres-Esquivel, L., Carrizales-Yañez, L., Díaz-Barriga, F.M., 2014. Genotoxic and Hematological Effects in Children Exposed to a Chemical Mixture in a Petrochemical Area in Mexico. *Arch Environ Contam Toxicol.* 67,1–8. DOI 10.1007/s00244-014-9999-4
- Pereira, T.S., Beltrami, L.S., Rocha, J.A.V., Broto, F.P., Comellas, L.R., Salvadori, D.M.F., Vargas, V.M.F., 2013. Toxicogenetic monitoring in urban cities exposed to different airborne contaminants. *Ecotox Environ Safe.* 90, 174–182.
- 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.
- Pope III, C.A., Burnett, R.T., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Ito, K., Thurston, G.D., 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality and long-term exposure to fine particulate air pollution. *J. Am. Med.* 287, 1132–1141.
- Ramirez, A., Saldanha, P.H., 2002. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet. Mol. Res.* 1, 246–260.

- Ravindra, K., Bencs, L., Wauters, E., De Hoog, J., Deutsch, F., Roekens, E., Bleux, N., Berghmans, P., Van Grieken, R., 2006. Seasonal and site-specific variation in vapour and aerosol phase PAH over Flanders (Belgium) with anthropogenic activities. *Atmos Environ.* 40, 771-785.
- Salvi, S., 2007. Health effects of ambient air pollution in children. *Paediatric Respiratory Reviews* 8, 275-280.
- Sánchez-Guerra, M., Pelallo-Martínez, N., Díaz-Barriga, F., Rothenberg, S.J., Hernández-Cadena, L., Faugeron, S., Oropeza-Hernández, L.F., Guaderrama-Díaz, M., Quintanilla-Vega, B., 2012. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and DNA damage in Mexican children. *Mutat. Res.* 742, 66–71. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.12.006
- Sánchez-Guerra, M., Pelallo-Martínez, N., Díaz-Barriga, F., Rothenberg, S.J., Hernández-Cadena, L., Faugeron, S., Oropeza-Hernández, L.F., Guaderrama-Díaz, M., Quintanilla-Veja, B., 2012. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and DNA damage in Mexican children. *Mutat Res* 742, 66– 71. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.12.006
- 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_{2.5}) associated with genetic biomonitoring in children. *Mutation Research* 778, 44–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.11.006>.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
- Sisenando, H.A., Medeiros, S.R.B, Artaxo, P., Saldiva, P.H.N., Hacon1, S.S., 2012. Micronucleus frequency in children exposed to biomass burning in the Brazilian Legal Amazon region: a control case study. *BMC Oral Health* 12:6. doi:10.1186/1472-6831-12-6
- Sram, R.J., Svecova, V., Rossnerova, A., 2016. Systematic review of the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay to measure DNA damage induced by

- exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res.* 770, 162-169. doi: 10.1016/j.mrrev.2016.07.009. Epub 2016 Jul 28.
- Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., Fenech, M. 2009. Buccal micronucleus cytochrome assay. *Nat Protoc.* 4(6), 825-37. doi: 10.1038/nprot.2009.53. Epub 2009 May 7.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 206-221.
- Tobiszewski, M., Namiesnik, J., 2012. PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. *Environ. Pollut.* 162, 110 -119.
- Tolbert, P.E., Shy, C.M., Allen, J.W., 1991. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *Am J Epidemiol.* 134(8), 840-50.
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency), 1993. Provisional guidance for quantitative risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons. Cincinnati, OH: Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office.
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2014. Method 8270D - Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8270d.pdf>
- 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., 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.

- Watanabe, M., Ishidate Jr., M., Nohmi, T., 1989. A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. *Mutat. Res.* 216, 211–220.
- Watanabe, M., Ishidate Jr., M., Nohmi, T., 1990. Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels. *Mutat. Res.* 234, 337–348
- 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, 2013. Review of evidence on health aspects of air pollution. REVIHAAP PROJECT: Technical Report. Copenhagen, 309p.
- WHO- World Health Organization, 2016. Ambient air pollution: A global assessment of exposure and burden of disease. Geneva, Suíça. 131pgs. ISBN 9789241511353
- Wild, C.P., Kleinjans, J., 2003. Children and increased susceptibility to environmental carcinogens: evidence or empathy. *Cancer Epidem Biomar* 12,1389-94.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Associar estudos de biomonitoramento ambiental e humano permite, além de detectar a presença de poluentes danosos nas matrizes ambientais, investigar seus possíveis efeitos à saúde das populações expostas. Áreas próximas a grandes empreendimentos industriais são de especial interesse para estas avaliações, pois as concentrações de poluentes tendem a ser mais elevadas próximo as fontes de emissão. Além disso, o desenvolvimento econômico gerado por esses empreendimentos, em geral, leva ao crescimento de áreas residenciais e comerciais em seus arredores. Contudo, o material particulado atmosférico inalável pode permanecer em suspensão por longos períodos e ser transportado por grandes distâncias, impactando a qualidade do ar mesmo em regiões afastadas destes empreendimentos.

Este estudo avaliou o efeito genotóxico de partículas inaláveis finas de áreas sob influência do Pólo Petroquímico do Sul, em testes *in vitro*, além de biomarcadores de genotoxicidade em amostras de sangue periférico e mucosa oral de escolares da região.

Todos os locais avaliados apresentaram respostas positivas em pelo menos um ensaio de genotoxicidade. Entretanto, avaliando conjuntamente todos os biomarcadores empregados, os resultados do local NO evidenciaram sua pior qualidade. A avaliação ambiental do MP2,5 através de três biomarcadores *in vitro* – mutação reversa em *Salmonella*, danos pelo ensaio cometa e indução de micronúcleos em células V79- foram concordantes na caracterização deste local com pior qualidade, sendo compatível com a maior dispersão de poluentes na primeira direção dos ventos e sua proximidade ao complexo petroquímico. Ainda, foram observadas respostas mutagênicas mais elevadas e perfil de HPAs mais tóxico (Σ TEQ) no material particulado deste local. Os escolares dessa área apresentaram maior dano primário ao DNA no ensaio cometa. Também apresentaram maior indução de quebra ou perda cromossômica (MN), comparativamente ao estudo realizado nesse município, em área de risco contaminada por preservantes de madeira, e seu local-referência.

Em NO II, também na primeira direção dos ventos, mas distante 35Km da fonte emissora, verificaram-se respostas mutagênicas positivas induzidas por MP10, porém com menor potencial.- Os escolares avaliados apresentaram valores de MN em sangue periférico similares aos de NO, mas elevados em relação aos da área de referência externa (Coronas et

al., 2016). Ainda, a maior frequência de brotos nucleares verificada nestes escolares, aliada a diferente composição de HPAs e perfil de mutagenicidade sugerem que este local também se encontra sob influência de poluentes, embora com características distintas das encontradas em NO.

No local NE, foi realizado apenas o biomonitoramento ambiental, que mostrou resultados genotóxicos intermediários entre NO e NO II, possivelmente refletindo seu posicionamento próximo a fonte emissora, mas na segunda direção dos ventos.

A maioria das mostras apresentaram concentrações de MP_{2,5} ou MP₁₀ inferiores as recomendadas em normas de qualidade do ar, entretanto, efeitos adversos foram detectados em todas as amostras, corroborando a inadequação destas normas estabelecidas como indicadores de qualidade. A determinação das concentrações de partículas em suspensão é mundialmente utilizada como um dos parâmetros de avaliação da qualidade do ar. No Brasil, a legislação reguladora da concentração máxima de material particulado atmosférico data de 1990, referindo-se às partículas totais em suspensão e às partículas inaláveis grossas, inexistindo regulamentações acerca da concentração de partículas MP_{2,5}. Assim sendo, é importante que os padrões de qualidade do ar adotados pela legislação nacional sejam revisados. A concentração de MP₁₀ em amostragens de 24hs, permitida na legislação brasileira, é três vezes maior que a recomendada pela OMS (WHO, 2006). Além da redução dos limites propostos para MP₁₀, a incorporação de parâmetros considerando MP_{2,5}, já realizada em outros países, se faz necessária devido ao maior risco de exposição a essas partículas, que constituem a fração inalável capaz de atingir a região alveolar.

Quanto aos bioensaios utilizados na avaliação ambiental, o ensaio *Salmonella*/microsoma mostrou-se sensível e eficiente ao caracterizar a mutagenicidade do material particulado inalável. A associação de linhagens sensíveis a nitrocompostos no estudo evidenciou o papel que estas substâncias desempenham na mutagenicidade do material particulado, e a importância de desenvolver práticas de monitoramento de seus níveis ou efeitos no ambiente, uma vez que através das linhagens clássicas o efeito mutagênico detectado seria limitado. Ainda, a linhagem YG1024, na presença de metabolização, permitiu detectar a presença de amins aromáticas mutagênicas nas amostras, grupo de compostos ainda pouco avaliados nas partículas atmosféricas. A avaliação integrando o uso de diferentes linhagens e da fração de metabolização hepática auxiliaram na compreensão das classes de

compostos presentes na área. Dessa forma, é importante que linhagens específicas a compostos químicos de interesse na área investigada sejam acrescentadas nos estudos ambientais sempre que possível.

Ao longo de todo o período do estudo (capítulos 1 e 2), foram observados picos de mutagenicidade no ensaio *Salmonella*. Estes resultados ocorridos no ano de 2013 (capítulo 1), não se repetiram durante a segunda etapa do estudo (2014), evidenciando a necessidade de monitoramentos por períodos prolongados, a fim de detectar possíveis anomalias. Estes picos, geralmente associados com aumento nas emissões de poluentes, são referidos pela OMS como causadores de elevação nas taxas de morbidade e mortalidade. Por esta razão, são incorporados nos protocolos de controle atmosférico, padrões baseados em medições de 24hs, além das médias anuais, permitindo a detecção dessas anormalidades.

Uma vez que as agências internacionais recomendam uma bateria de ensaios na avaliação da genotoxicidade de misturas complexas, as análises do MP2,5 através do ensaio cometa e do teste de micronúcleo, ampliaram os níveis de resposta, mostrando a contribuição de agentes clastogênicos e/ou aneugênicos. Nossos resultados mostraram que a complexa composição do MP2,5 pode provocar diversos efeitos genotóxicos, sendo a utilização de diferentes bioensaios fundamental para o entendimento dos efeitos dessa matriz.

A análise dos biomarcadores genéticos em crianças apontou os ensaios EC e CBMN-cyt em sangue periférico como mais adequados para identificar efeitos causados por poluentes atmosféricos, relativamente ao ensaio do micronúcleo em mucosa oral, apesar da maior facilidade de obtenção destas células. O sangue periférico é uma matriz ideal para estudo da maioria das substâncias químicas porque está em contato com todos os tecidos do corpo, sendo sua principal desvantagem a natureza invasiva da coleta que afeta a adesão de voluntários.

O local NO II teve menor adesão de voluntários, o que prejudicou parte das análises dos biomarcadores. Consideramos esta baixa participação como consequência do receio de muitas crianças pela coleta de sangue intravenoso. Alguns voluntários concordaram em participar do estudo com a condição de doarem somente amostras de mucosa oral, ressaltando esse aspecto por várias vezes antes da coleta, o que nos leva a crer que a menção à coleta sanguínea no projeto levou a desistência de muitos pais ou responsáveis, antes de maiores informações

serem disponibilizadas. Esse aspecto deve ser levado em consideração em estudos realizados em crianças.

Previamente ao estudo de biomonitoramento humano foi realizada uma reunião com representantes das secretarias e vigilância em saúde municipal e estadual, da secretaria de educação municipal e das escolas envolvidas no estudo. Nessa reunião, foram apresentados os objetivos do estudo e solicitado o auxílio dos gestores públicos. Essa iniciativa foi importante pois as escolas participantes atuaram ativamente na divulgação do estudo, intermediando a comunicação com os pais e responsáveis pelos escolares. Observamos que a escola com maior adesão de voluntários foi aquela em que o corpo docente e administrativo mostrou maior entusiasmo com o projeto. Assim, recomendamos que em estudos futuros, a abordagem às escolas participantes concentre esforços no envolvimento do seus funcionários, que atuarão como multiplicadores da necessidade do estudo.

Os resultados gerados por estudos de biomonitoramento ambiental e humano em áreas impactadas necessitam de valores de referência comparativos para determinar o grau de contaminação à que os diferentes organismos estão expostos. Populações de referência para estudos de biomonitoramento humano precisam levar em consideração características regionais como hábitos alimentares, estilo de vida, condições sociais, econômicas e culturais, etnia e suscetibilidade genética, as quais podem alterar o impacto associado a determinado fator de risco (Neri et al., 2006). Entretanto, encontrar áreas isentas de impacto ambiental atualmente é uma tarefa extremamente difícil, principalmente ao tratar com poluição atmosférica, uma vez que os poluentes do ar ultrapassam limites geográficos e podem se dispersar por milhares de quilômetros. Estudo realizado em área considerada como referência para qualidade do ar no Estado (Silva et al., 2015), distante de grandes centros urbanos e industriais e fora da pluma de dispersão atmosférica de poluentes, mostrou a presença de mutagênese e HPAs no particulado, provavelmente relacionados a emissões veiculares locais. Este dado demonstra a complexidade envolvida na escolha de locais de referência, uma vez que as emissões veiculares estão presentes na maioria das comunidades.

No município de Triunfo, várias fontes poluidoras do ar estão presentes, como emissões veiculares de rodovias, usinas termoelétricas, indústria petroquímica e impactos de fontes nos municípios vizinhos como indústrias de celulose, refinarias de petróleo e grandes centros urbanos. No presente estudo, buscamos encontrar uma escola sujeita a menor poluição

atmosférica, que pudesse ser utilizada como referência para o biomonitoramento humano. Escolares da rede pública municipal de Triunfo seriam os mais adequados pois apresentariam características sociais, econômicas e culturais mais semelhantes aos escolares próximos ao complexo industrial. Dessa forma, os dois grupos de voluntários teriam acesso a serviços públicos de saúde e educação semelhantes, sujeitos aos mesmos órgãos de gestão (secretarias municipais de educação e saúde).

Os resultados gerados neste estudo permitiram evidenciar que as crianças avaliadas estão expostas a uma mistura de contaminantes de diferentes fontes, sendo a proximidade da indústria petroquímica um contribuinte aos fatores de risco. Os padrões de controle da qualidade ambiental não são suficientes para garantir a saúde das populações expostas. Dessa forma, os dados do presente estudo deverão ser comunicados à Diretoria Técnica da Fundação Estadual de Proteção Ambiental (Fepam), para que sejam tomadas medidas cabíveis de controle da poluição atmosférica na região, visando reduzir os riscos relativos à exposição ambiental. Os resultados do presente estudo serão relatados em reuniões com as Secretarias Municipal e Estadual de Saúde, e com os serviços de Vigilância em Saúde, tendo em vista a elaboração de uma estratégia de comunicação dos resultados à população e de protocolos de atendimento e cuidados à saúde nos postos locais.

A vigilância da exposição humana a contaminantes ambientais tem sido considerada uma das prioridades em programas de saúde pública. Assim são relevantes estudos populacionais que busquem definir marcadores de efeitos precoces desses agentes na qualidade de vida e na saúde humana. Embora as crianças sejam mais suscetíveis a contaminantes ambientais do que os adultos, poucos estudos vêm sendo realizados avaliando os efeitos de poluentes atmosféricos através de biomarcadores de genotoxicidade nessa faixa etária.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1997. ABNT-NBR-9547: Material particulado em suspensão no ar ambiente - Determinação de concentração total pelo método do amostrador de grande volume. Rio de Janeiro. 14p
- Aguirre, A. A., Beasley, V. R., Augspurger, T., Benson, W.H., Whaley, J., Basu, N. 2016. One Health—Transdisciplinary Opportunities for SETAC Leadership in Integrating and Improving the Health of People, Animals, and the Environment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35:10. DOI: 10.1002/etc.3557
- Akyuz, M.; Cabuk, H., 2010. Gas-particle partitioning and seasonal variation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere of Zonguldak, Turkey. *Sci. Total Environ.*, 408, 5550–5558.
- Albuquerque M., Coutinho, M., Borrego, C., 2016. Long-term monitoring and seasonal analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) measured over a decade in the ambient air of Porto, Portugal. *Science of the Total Environment*. 543, 439–448. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.064>
- Angerer, J., Ewers, U., Wilhelm, M., 2007. Human biomonitoring: State of the art. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 210, 201–228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.01.024>
- Armstrong, T.W., Zaleski, R.T., Konkell, W.J., Parkerton, T.J., 2002. A tiered approach to assessing children's exposure: a review of methods and data. *Toxicol. Lett.* 127, 111-119.
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1995. Toxicological profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- AVMA - American Veterinary Medical Association, One Health Initiative Task Force. 2008. One Health: A New Professional Imperative. Schaumburg, IL, USA.

- Azqueta, A., Collins, A.R. 2013. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol* 87, 949–968. doi 10.1007/s00204-013-1070-0
- Barra, R., Castillo, C., Torres, J.P., 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the South American environment. *Rev Environ Contam Toxicol*. 191, 1-22.
- Bayne, B.L., Brown, D.A., Burns, K., Dixon, D.R., Ivanovici, A., Livingstone, D.A., Lowe, D.M., Moore, M.N., Stebbing, A.R.D., Widdings, J., 1985. *The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals*. Praeger, New York.
- Belfiore, N. M., Anderson, S.L., 2001. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutat. Res.*, 489, 97-122.
- Bennett, W.D., Zeman, K.L., 1998. Desposition of fine particles in children spontaneously breathing at rest. *Inhal Toxicol* 10, 831–842.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Nina Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M., 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 28,(3), 625–631. doi:10.1093/carcin/bgl177
- Boström, C.E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernström, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Rannug, A., Törnqvist, M., Victorin, K., Westerholm, R., 2002. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspect*. 110, 451-88.
- BRASIL, Conselho Nacional do Meio Ambiente. 1990. Resolução CONAMA nº 003. Padrões Nacionais de Qualidade do Ar. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 28/06/1990. P. 15937–15939.
- Braskem, 2016. O setor petroquímico. Disponível em: <http://www.braskem-ri.com.br/o-setor-petroquimico>

- 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_{2.5}) using *Salmonella*, plants and mammalian cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 94, 14–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.04.014>.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2011. Qualidade do ar Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/ar/informações-básicas/poluentes>.
- Chen, G., White, P.A., 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutat. Res.*, 567, 151-225.
- Churg, A., Brauer, M., 1997. Human lung parenchyma retains PM_{2.5}. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 155 (6), 2109-2111.
- Claxton, L., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E., Zeiger, E., 1987. Guide for the *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome tests for bacterial mutagenicity. *Mutat. Res.* 189, 83-91.
- Claxton, L., Houk, V.S., Hughes, T.J., 1998. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res.* 410, 237-243.
- 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., 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., Woodall Jr., G.M., 2007. A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. *Mutat. Res.* 636, 36–94.
- Clement, 1988. Comparative potency approach for estimating the cancer risk associated with exposure to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. Apud: U.S. Environmental Protection Agency, 2010. Development of a relative potency factor (RPF) approach for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures. EPA/635/R-08/012^a Washington, DC. Disponível em www.epa.gov/iris

- Collins, A.R., 2015. The comet assay: a heavenly method! *Mutagenesis*. 30, 1–4. doi:10.1093/mutage/geu079
- 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.084>
- Coutts, C., Hahn, M., 2015. Green Infrastructure, Ecosystem Services, and Human Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 12(8), 9768-9798. doi:10.3390/ijerph120809768
- Da Silva, J. 2016. DNA damage induced by occupational and environmental exposure to miscellaneous chemicals. *Mutat. Res.* 770, 170–182.
- Degeling, C., Johnson, J., Kerridge, I., Wilson, A., Ward, M., Stewart, C., Gilbert, G. 2015. Implementing a One Health approach to emerging infectious disease: reflections on the socio-political, ethical and legal dimensions. *BMC Public Health* 15:1307. DOI 10.1186/s12889-015-2617-1
- De Kok, T.M.C.M., Drieste, H.A.L., Hogervorst, J.G.F., Briedè, J.J., 2006. Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: a review of recent studies. *Mutat. Res.* 613, 103–122.
- Depledge, M.H., Fossi, M.C., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment. *Ecotoxicology*. 3, 161-172. doi:<http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.155.6.9196123>
- 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.

- EEA - European Environment Agency. 2015. The European environment — state and outlook 2015: synthesis report. Copenhagen, Dinamarca. ISBN 978-92-9213-515-7. doi:10.2800/944899
- EEC - European Commission, 2004. Directiva 2004/107/ce do Parlamento Europeu e do Conselho relativa ao arsênio, ao cádmio, ao mercúrio, ao níquel e aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no ar ambiente. Jornal Oficial da União Europeia, L 23/3.
- Englert, N., 2004. Fine particles and human health - a review of epidemiological studies. *Toxicol Lett.* 149, 235–242.
- Esteban, M., Castaño, A., 2009. Non-invasive matrices in human biomonitoring: A review. *Environment International.* 35, 438–449. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2008.09.003>
- Fenech, M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols.* 2 (5), 1084 - 1104. doi:10.1038/nprot.2007.77
- Fenech, M., 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat. Res.* 600, 58 – 66.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* 147,29 -36.
- Feng, S., Gao, D., Liao, F. , Zhou, F., Wang, X. 2016. The health effects of ambient PM2.5 and potential mechanisms. *Ecotoxicol. Environ Saf.* 128. 67–74.
- FEPAM- Fundação Estadual de Proteção Ambiental. 2008. Estratégias ecotoxicológicas para avaliação de risco aplicadas a bacia hidrográfica do Rio Caí: Atlas ambiental. Porto Alegre, 164p.
- Fernandez, M.D., Cagigal, E., Vega, M.M., Urzelai, A., Babin, M., Pro, J., Tarazona, J.V., 2005. Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. *Ecotoxicol Environ Saf.* 62, 174–184.
- Ferreira, T.M., Forti, M.C., Alva, P.C., 2011. Caracterização morfológica e química do particulado atmosférico em uma região urbana: São José dos Campos. INPE, São José dos Campos. Disponível em: <http://urlib.net/8JMKD3MGP7W/39PAU6H>

- Finlayson-Pitts, B.J., Pitts, J.N., 2000. Particles in the troposphere. In: Chemistry of the Upper and Lower Atmosphere: Theory, Experiments, and Applications. Academic Press. California, USA. pp. 349-435. ISBN: 978-0-12-257060-5. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-257060-5.50027-7>
- Glei, M., Schneider, T., Schlörmann, W., 2016. Comet assay: an essential tool in toxicological research. Arch Toxicol. 90, 2315–2336. doi 10.1007/s00204-016-1767-y
- Gomes, G., Dvorsak, P., Heil, T., 2005. Indústria petroquímica Brasileira: situação atual e perspectivas. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, 21, 75-104.
- Gonzalez, L., Kirsch-Volders, M., 2016. Biomonitoring of genotoxic effects for human exposure to nanomaterials: The challenge ahead. Mutat Res /Reviews. 768, 14–26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.03.002>
- Grantz, D.A., Garner, J.H.B., Johnson, D.W., 2003. Ecological effects of particulate matter. Environ. Int. 29, 213– 239.
- Griffiths W. D.; DeCosemo G. A. L., 1994. The assesment of bioaerosols: A critical review. J. Aerosol Sci.,No. 8, 25, 1425 - 1458.
- Grigg J., Kulkarni N., Pierse N., Rushton L., O’Callaghan C., Rutman A., 2008. Black-pigmented material in airway macrophages from healthy children: association with lung function and modeled PM10. Res Rep Health Eff Inst.134,1–33.
- Grigg, J., 2009. Particulate Matter Exposure in Children: Relevance to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Proc Am Thorac Soc. 6, 564–569. doi: 10.1513/pats.200905-026RM
- Guderian R., 1977. Accumulation of pollutants in plant organs. Air pollution: phytotoxicity of acidic gases and its significance in air pollution control. Ecological studies. 22, 66– 74.
- Hartmann A., Agurell E., Beevers C.,Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A.,Smith A., Speit G., Thybaud V. and Tice R.R. 2003. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. Mutagenesis vol.18 no.1 pp.45–51.

- Hartmann, A., Elhajouji, A., Kiskinis, E., Poetter, F., Martus, H. J., Fjällman, A., Frieauff, W., Suter, W. 2001. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. *Food and Toxicol.*, 39, 843-858.
- Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, P., Macgregor, J.T., 1991. Micronuclei has an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ Mol. Mutagen.* 18, 277-291.
- Heddle, J.A., Fenech M., Hayashi, M., MacGregor J.T. 2011. Reflections on the development of micronucleus assays. *Mutagenesis*, 26 (1), 3-10. doi:10.1093/mutage/geq085
- Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, Z., Fenech, M., 2008. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat.Res.* 659, 93–108. doi:10.1016/j.mrrev.2008.03.007
- 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, 2010. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans - Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. 92, Lyon, France
- IARC - International Agency for Research on Cancer, 2016. Agents Classified by the IARC Monographs. Volumes 1–117. Online. Disponível em: http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015. Diretoria de Pesquisas - DPE - Coordenação de População e Indicadores Sociais - COPIS. Disponível: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=432200>
- IHME - Institute for Health Metrics and Evaluation. 2016. Rethinking Development and Health: Findings from the Global Burden of Disease Study. Seattle, WA: IHME.

Disponível em: <http://www.healthdata.org/policy-report/rethinking-development-and-health-findings-global-burden-disease-study>

- 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.
- Kim, K.N., Lim, Y.H., Bae, H.J., Kim, M., Jung, K., Hong, Y.C. 2016. Long-Term Fine Particulate Matter Exposure and Major Depressive Disorder in a Community-Based Urban Cohort. *Environ Health Perspect.* 124(10), 1547-1553. <http://dx.doi.org/10.1289/EHP192>.
- Kirkland, D, Speit, G., 2008. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens: III. Appropriate follow-up testing in vivo. *Mutat Res.* 654,114–132.
- Kirsch-Volders, M., Decordier, I., Elhajouji, A., Plas, G., Aardema, M. J., Fenech, M. 2011. In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. *Mutagenesis*, 26 (1). 177–184. doi:10.1093/mutage/geq068 -
- Kumaravel , T.S., Vilhar, B., Faux, S.P, Jha, A.N., 2009. Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol* 25:53–64.
- Langie, S. A.S., Azqueta, A., Collins, A.R.,2015. The comet assay: past, present and future . *Frontiers in Genetics.* 6, 1-3. doi: 10.3389/fgene.2015.00266
- 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, C.T., 1998.– Estudo Genotóxico de amostras ambientais através de métodos citogenéticos in vitro e in vivo. Tese de doutorado apresentada ao PPg Genética UFRGS. Porto Alegre.142p.

- Lemos,C.T., Terra, N.R., 2003. Poluição, causas, efeitos e controle. In: Genética Toxicologica. Da Silva, J., Erdtmann, B., Henriques, J. A. P.,(orgs)Ed Alcance. Porto Alegre. 424p.
- Levy, J.L., Susan Greco, L., Spengler, John D., 2002. The importance of population susceptibility for air pollution risk. *Environ. Health Perspect.* 110 (12) 1253– 1260, DOI: 10.1289/ehp.021101253.
- Lippmann, M., 2010. Targeting the components most responsible for airborne particulate matter health risks. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology.* 117-118. doi:10.1038/jes.2010.1
- Lippmann,M., 2009. Ambient particulate matter. In: Lippmann M. (ed). *Environmental Toxicants: Human Exposures and Their Health Effects*, 3rd edn. Wiley: New York, 317–365.
- Lopes, W.A., Andrade, J.B., 1996. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. *Quim Nova.* 19, 497-516.
- Manahan, S.E., 2003. *Toxicological chemistry and biochemistry*, 3 ed. CRC Press, Columbia.
- Marć, M., Tobiszewski, M., Zabiegała, B., Guardia, M., Namieśnik, J., 2015. Current air quality analytics and monitoring: A review. *Analytica Chimica Acta.* 853, 116–126.
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113, 173-215.
- McCann, J.; Choi, E.; Yamasaki, E.; Ames, B.N. (1975) Detection of carcinogens in the *Salmonella*/microsome test. Assay of 300 chemicals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 5135–5139.
- Meire, R. O., Azeredo, A., Torres, J.P.M., 2007. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Oecol. Bras.*, 11, 188-201
- Mills N. L. , Donaldson K.,Hadoke P. W.,Boon N. A., MacNee W., Cassee F. R, Sandström T., Blomberg A.; Newby D. E., 2009. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nature clinical practice cardiovascular medicine.* 1. doi:10.1038/ncpcardio1399

- Moore, M. N., Depledge M. H., Readman, J.W., Leonard, P. D.R., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat.Res.* 552, 247–268.
- Morakinyo O. M., Mokgobu M. I., Mukhola M. S., Hunter R. P., 2016. Health Outcomes of Exposure to Biological and Chemical Components of Inhalable and Respirable Particulate Matter. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 13, 592. doi:10.3390/ijerph13060592
- Mørck, T.A., Loock, K.V., Poulsen, M.B., Siersma, V.D., Nielsen, J.K., Hertel, O., Kirsch-Volders, M., Knudsen, L.E., 2016. Micronucleus frequency in Danish schoolchildren and their mothers from the DEMOCOPHES population. *Mutagenesis*. 31(1),1-8. doi: 10.1093/mutage/gev054. Epub 2015 Jul 17.
- Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455, 29-60.
- Moya, J., Bearer, C.F., Etzel, R.A., Children's behavior and physiology and how it affects exposure to environmental contaminants. *Pediatrics* 2004; 113(4 Suppl): 996–1006.
- Mugica, V., Hernández, S., Torres, M., García, R., 2010. Seasonal Variation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure Levels in Mexico City. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 60:5, 548-555, doi: 10.3155/1047-3289.60.5.548
- Needham, L.L., Calafat, A.M., Barr, D.B., 2007. Uses and issues of biomonitoring. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 210, 229–238. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2006.11.002>
- Needham, L.L., Patterson, D.G., Barr, D.B., Grainger, J., Calafat, A.M., 2005. Uses of speciation techniques in biomonitoring for assessing human exposure to organic environmental chemicals. *Anal Bioanal Chem.* 381, 397–404.
- Nisbet, I.C., LaGoy, P.K., 1992. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regul Toxicol Pharmacol.* 16(3), 290-300.

- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. 2016. OECD guideline for the testing of chemicals, Test No. 489: *In Vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay. OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264224179-en>
- Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashic, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res.* 567, 109–149.
- Peled, R., 2011. Who is at high risk? *Atmospheric environment.* 45, 1781-1785.
- 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.
- Pereira Netto, A.D., Moreira, J.C., Dias, A.E.X.O., Arbilla, G., Ferreira, L.F.V., Oliveira, A.S., Barek, J., 2000. Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their nitrated derivatives (NPAHs): a review of methodology. *Quim. Nova.* 23(6), 765-773.
- 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.
- Pun, V.C., Manjourides, J., Suh, H., 2016. Association of Ambient Air Pollution with Depressive and Anxiety Symptoms in Older Adults: Results from the NSHAP Study. *Environ Health Perspect.* [Epub ahead of print]. DOI: 10.1289/EHP494
- Rand, G.M., Petrocelli, S.R., 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology – methods and applications.* Hemisphere Publishing Corporation, Washington. 659p.

- Rhind, S.M., 2009. Anthropogenic pollutants: a threat to ecosystem sustainability? *Philosophical transactions of the royal society B*. 364 (1534). doi: 10.1098/rstb.2009.0122
- Salvi, S., 2007. Health effects of ambient air pollution in children. *Paediatric Respiratory Reviews* 8, 275-280.
- Santana, E., Cunha, K.B., Ferreira, A.L., Zamboni, A., 2012 - Padrões de qualidade do ar: Experiência comparada Brasil, EUA e União Europeia. Instituto de energia e meio ambiente, São Paulo, 81p.
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioral and physiological indicators of toxicity. *Aquat Toxicol.* 68, 369-392.
- 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 (PM2.5) associated with genetic biomonitoring in children. *Mutation Research* 778, 44-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.11.006>.
- Silva, F. S., Cristale J., André P.A., Saldiva P. H.N., Marchi M. R.R., 2010. PM2.5 and PM10: The influence of sugarcane burning on potential cancer risk. *Atmospheric Environment.* 44, 5133-5138. doi:10.1016/j.atmosenv.2010.09.001
- Slezakova, K., Castro, D., Delerue-Matos, C., Maria da Conceição Alvim-Ferraz, M.C., Morais, S., Maria do Carmo Pereira, M.C., 2013. Impact of vehicular traffic emissions on particulate-bound PAHs: Levels and associated health risks. *Atmos. Res.* 127, 141-147. doi:10.1016/j.atmosres.2012.06.009
- 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

- Squadrito, G. L., Cueto, R., Dellinger, B., Pryor, W. A., 2001. Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. *Free Radical Bio Med.* 31, 1132–1138.
- Strolin, B.M., Baltes, E.L., 2003 Drug metabolism and disposition in children. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 17, 281-299.
- Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., Fenech, M. 2009. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 4(6), 825-37. doi: 10.1038/nprot.2009.53. Epub 2009 May 7.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221.
- Tolbert, P.E., Shy, C.M. & Allen, J.W., 1992. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res.* 271, 69–77
- Umbuzeiro, G. A., Vargas, V. M. F., 2003. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos, in: Ribeiro, L. R., Salvadori, D. M. F., Marques, E. K. (Eds.), *Mutagênese ambiental*. Ed. Ulbra, Canoas, 356p.
- USEPA, 2008. Integrated Review Plan for the National Ambient Air Quality Standards for Particulate Matter. Research Triangle Park, North Carolina, report n° EPA/452/R-08-004. Disponível em: http://www.epa.gov/ttnnaqs/standards/pm/data/2008_03_final_integrated_review_plan.pdf
- USEPA, 2010. National ambient air quality standards (NAAQS). Disponível em <http://www.epa.gov/air/criteria.html>. Acesso em junho de 2011.
- Valverde, M., Rojas, E., 2009. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutat. Res.* 681,93-109.

- 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.
- Van Dingenen, R., Raes, F., Putaud, J. P., Baltensperger, U., Charron, A., Facchini, M. C., Decesari, S., Fuzzi, S., Gehrig, R., Hansson, H. C., Harrison, R. M., Ugliin, C. H., Jones, A. M., Laj, P., Lorbeer, G., Maenhaut, W., Palmgren, F., Querol, X., Rodriguez, S., Schneider, J., Brink, H., Tunved, P., Tørseth, K., Wehner, B., Weingartner, E., Wiedensohler, A., Wählin, P., 2004. A European aerosol phenomenology-1: physical characteristics of particulate matter at kerbside, urban, rural and background sites in Europe. *Atmos Environ.* 38, 2561–2577.
- 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., 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.
- Vieira, N.R., 2009. Poluição do ar: indicadores ambientais. E-papers, Rio de Janeiro. 220p.
- Viidanoja, J; Sillanpaa, M. Laakia, J; Kerminen, V.; Hillamo, R.; Aarnio, P.; Koskentalo, T., 2002. Organic and black carbon in PM_{2.5} and PM₁₀: 1 year of data from an urban site in Helsinki, Finland. *Atmos. Environ.* 302, 3183-3193.
- Weinmayr, G., Hennig, F., Fuks, K., Nonnemacher, M., Jakobs, H., Möhlenkamp, S., Erbel, R., Jöckel, K.H., Hoffmann, B., Moebus, S., Heinz Nixdorf Recall Investigator Group. 2015. Long-term exposure to fine particulate matter and incidence of type 2 diabetes mellitus in a cohort study: effects of total and traffic-specific air pollution. *Environ Health.* 19, 14-53. doi:10.1186/s12940-015-0031-x.
- White, P. A., Claxton, L. D., 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mut. Res.* 567, 227–345.
- WHO – World Health Organization Europe (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, 2013. Review of evidence on health aspects of air pollution. REVIHAAP PROJECT: Technical Report
- WHO - World Health Organization, 2016a. Ambient air pollution: A global assessment of exposure and burden of disease. Geneva, Suíça. 131pgs. ISBN 9789241511353
- WHO - World Health Organization. 2016b. Preventing disease through healthy environments. A global assessment of the burden of disease from environmental risks. ISBN 978 92 4 156519 6.
- Wild, C.P., Kleijnans, J., 2003. Children and increased susceptibility to environmental carcinogens: evidence or empathy. *Cancer Epidem Biomar* 12,1389-94.
- Yusa, V. Millet, M., Coscolla, C., Roca, M., 2015. Analytical methods for human biomonitoring of pesticides. A review. *Analytica Chimica Acta*. 891, 15–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.05.032>
- Yusa, V., Ye, X., Calafat ,A.M., 2012. Methods for the determination of biomarkers of exposure to emerging pollutants in human specimens. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 38, 129–142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2012.05.004>
- Zeiger, E., 1998. Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: premises, promises, and performance. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 28, 85–95.

6. ANEXOS

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos convidando a criança pela qual você é responsável a participar do projeto de pesquisa "*Biomarcadores precoces de genotoxicidade como ferramenta para prevenir efeitos da poluição atmosférica na saúde humana*". Este projeto tem como objetivo avaliar sinais iniciais para detectar efeitos da poluição ambiental na saúde humana. Estes sinais podem ser observados através de testes (que avaliam danos nas células) e entrevista individual (informações sobre alimentação, medicamentos, saúde, moradia).

O desconforto que a criança sob sua responsabilidade passará será mínimo, estando basicamente relacionados à coleta de 4 mL de sangue (mais ou menos uma colher de chá), que implica em uma sensação dolorosa leve e temporária na região da coleta, havendo possibilidade de formação de um pequeno hematoma na região (mancha escura). A coleta de sangue é feita com material limpo, esterilizado e descartável (sendo usado material novo para cada pessoa), sem risco de transmitir qualquer doença. Será realizada, também, coleta de células bucais de forma suave, sem dor, utilizando um tipo de escova dental pequena. A coleta de material será realizada por profissional habilitado preferencialmente em laboratório de análises e eventualmente na escola ou residência da criança. Não são conhecidos riscos para a coleta destas células da boca. O sangue coletado será utilizado para avaliação de danos e extração do DNA e para a realização de exames clínicos. Na primeira etapa do estudo será realizado hemograma completo com plaquetas. Posteriormente, mais exames (creatinina, uréia, TGO, TGP e TSH) poderão ser solicitados a critério médico. O sangue coletado também será utilizado com o objetivo de avaliar se existem danos no material genético (DNA), e para estudos que esclareçam o papel genético no aumento de risco a danos no DNA. Os resultados destes exames serão encaminhados para os médicos da unidade de saúde básica local e estarão à disposição dos voluntários em atendimentos de rotina a esta população.

O resultado destes exames poderá ou não trazer benefícios para os participantes da pesquisa, mas, servirão para avaliar a sensibilidade da população de sua região com relação aos efeitos dos poluentes ambientais.

As análises serão realizadas no Laboratório de Biologia da Fundação Estadual de Proteção Ambiental, FEPAM, em trabalho conjunto com o Curso de Pós-graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. Os exames clínicos

serão realizados por laboratório de análises clínicas externo habilitado para tais procedimentos. Todos os resultados ficarão sob a total responsabilidade dos pesquisadores deste laboratório. Os pesquisadores se comprometem em manter os dados de identificação pessoal dos participantes em caráter confidencial e a divulgar os resultados de maneira agrupada, ou seja, sem a identificação dos indivíduos que participaram do estudo.

Esta pesquisa poderá trazer benefícios para a população em geral, possibilitando selecionar testes que identifiquem os efeitos iniciais de substâncias perigosas aos organismos antes que ocorram problemas graves de saúde.

A participação da criança pela qual você é responsável no estudo é totalmente voluntária, e a não participação ou desistência após ingressar no estudo não implicará em nenhum tipo de prejuízo para o participante. A participação no estudo não implicará em nenhum tipo de avaliação curricular na escola da criança. Não haverá nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e o participante não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Qualquer dúvida sobre este estudo e/ou explicação mais específica dos procedimentos realizados poderão ser esclarecidos antes e durante o curso da pesquisa, contatando a pesquisadora responsável, Vera Maria Ferrão Vargas, no Laboratório de Biologia da FEPAM, localizado na Av. Salvador França, 1707, ou através do telefone (51) 3334-6765. O Comitê de Ética em Pesquisa que avaliou o estudo poderá ser contatado para esclarecimento de dúvidas, no 2º andar do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sala 2227, ou através do telefone 33597640, das 8h às 17h, de segunda à sexta.

O presente documento é assinado em duas vias, sendo uma delas entregue ao participante e outra mantida pelo grupo de pesquisadores.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____

Nome do responsável: _____

Assinatura: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____

Local e data: _____

ANEXO B – QUESTIONÁRIO**QUESTIONÁRIO**

Data ___/___/_____

I – Identificação**Identificação do informante responsável**

N° de registro: _____

Nome: _____

Identidade: _____ Profissão: _____

Data de nascimento: ___ / ___ / _____

Idade: _____

Endereço: _____

CEP: _____ - _____ Telefone para contato: _____

Grau de parentesco com a criança: _____

Identificação da criança

N° de registro: _____

Nome: _____

Data de nascimento: ___ / ___ / _____

Idade: _____

Sexo: M F

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

Endereço: _____

CEP: _____ - _____ Telefone: _____

Nº de registro do voluntário no estudo: _____

II – Criança, mãe e pai biológicos.

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

SE SIM: Em que escola? _____ Local: _____

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

- (1) em casa (2) na casa de parentes (3) na casa de amigos (4) outros
(8) não sabe (9) não respondeu

III – Gestação e primeiros meses

14. Durante a gravidez a mãe biológica fumou?

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

21. Onde nasceu <CRIANÇA>?

(1) Hospital: _____ Cidade: _____

(2) Em casa: _____ Cidade: _____

(3) Outro: _____

(8) não sabe (9) não respondeu

22. O parto <CRIANÇA> foi:

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

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

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

24. Quanto <CRIANÇA> pesou ao nascer?

_____g (8) não sabe (9) não respondeu

25. Quanto <CRIANÇA> mediu ao nascer?

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

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

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

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

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

27. <CRIANÇA> mamou no peito?

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

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

IV – Fumo e outras exposições atuais

28. A mãe está trabalhando no momento?

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

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

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

Há quanto tempo: _____ (8) ns (9) nr

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

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

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

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

Há quanto tempo: _____ (8) ns (9) nr

30. Você fuma?

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

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

31. O marido/companheiro fuma?

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

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

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

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

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

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

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

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

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

34. Comem peixe pescado na região?

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

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

35. <CRIANÇA> come peixe pescado na região?

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

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

V – Casa

36. Quantas pessoas moram na sua casa? _____ pessoas
37. Quantos entre cinco e onze anos moram na sua casa? _____ Crianças
38. Tem algum animal de estimação na sua casa? Se SIM que tipo de animal tem?
 (1) Gato (2) Cachorro (3) Gato e cachorro (4) Passarinho (5) Outros
 (6) não tem (8) não sabe (9) não respondeu
39. Tem criação de algum animal? Se SIM de qual(s) animal(s) tem?
 (1) Gado (2) Galinha (3) Porco (4) Cabra/Ovelha (5) Outros
 (6) não tem (8) não sabe (9) não respondeu
- SE TEM:** Consome carne ou derivados desses animais?
 (1) Leite (2) Carne (3) Ovos (4) Outros (5) não consome (8) não sabe (9) não respondeu
40. Consome carne ou produtos derivados de animais criados nessa área (vizinhos)?
 (1) Sim (2) Não (8) não sabe (9) não respondeu
- SE SIM:** O que consome? (1) Leite (2) Carne (3) Ovos (4) Outros
 Com que frequência por semana? ____ dias na semana (8) ns (9) nr
41. Tipo de casa em que <CRIANÇA> mora:
 (1) tijolos com reboco (2) tijolos sem reboco (3) madeira (4) mista (tijolo e madeira) (5) outro: _____ (8) não sabe (9) não respondeu
42. Como é o chão da peça onde <CRIANÇA> dorme?
 (1) madeira (tábua ou parque) (2) lajota/ladrilho/tijoleta (3) cimento (4) carpete
 (5) chão batido (6) outro: _____ (8) não sabe (9) não respondeu
43. Onde a <CRIANÇA> passa mais tempo brincando ?
 (1) no quarto em que dorme (2) na sala (3) no quintal/pátio (4) na rua
 (5) na casa de amigos (6) outro: _____ (8) não sabe (9) não respondeu
44. Tem água encanada em casa?

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

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

(1) CORSAN (2) poço artesiano (3) mineral (4) outro: _____
(8) não sabe (9) não respondeu

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

(1) CORSAN (2) poço artesiano (3) outro: _____
(8) não sabe (9) não respondeu

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

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

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

(1) CORSAN (2) poço artesiano (3) Outro: _____
(8) não sabe (9) não respondeu

48. Consome plantas cultivadas nessa área (vizinhos)?

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

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

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

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

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

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

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

50. Qual o destino do esgoto da casa?

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

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

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

52. É usada alguma coisa para aquecer a casa?

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

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

(1) estufa elétrica (2) estufa a gás (3) lareira/salamandra (4) álcool
(5) fogão (6) ar condicionado (8) não sabe (9) não respondeu

() outro: _____

53. Tem fogão em casa?

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

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

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

(9) não respondeu

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

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

54. Há quanto tempo vocês moram nesta casa?

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

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

Onde? Bairro 1: _____

Bairro 2: _____

Bairro 3: _____

Bairro 4: _____

(8) não sabe (9) não respondeu

VI- Saúde da criança

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

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

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

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

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

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

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

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

60. Alguma vez na vida a criança já teve asma ou bronquite?

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

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

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

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

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

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

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

64. A criança baixou hospital alguma vez?

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

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

Motivos de internações: _____

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

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

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

Motivos de internações: _____

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

Se SIM quais são elas? _____

Quando? _____

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

(1) Ninguém teve

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

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

(8) não sabe (9) não respondeu

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

(1) Ninguém teve

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

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

(8) não sabe (9) não respondeu

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

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

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

70. A <criança> está usando alguma medicação?

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

SE SIM Qual?

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

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

Nome da medicação: _____

Freqüência: _____

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

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

SE SIM Qual?

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

Nome da medicação: _____

Freqüência: _____

Há quanto tempo deixou? _____

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

(1) Sim (2) Não

SE SIM: O quê? _____

73. A <criança> alimenta-se de:

Alimentos construtores:

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

Alimentos reguladores:

() verduras () frutas () legumes

Carboidratos:

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

ANEXO C - PARECER DE APROVAÇÃO ESTUDO



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

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

Projeto: 07-042

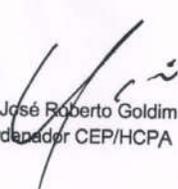
Pesquisador Responsável
 VERA MARIA FERRÃO VARGAS

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

	Data da Versão:
ADENDO AO PROJETO 18/09/2014	18/09/2014
TCLE ATUALIZADO 2014	20/10/2014

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

Porto Alegre, 20 de outubro de 2014.


 Prof. José Roberto Goldim
 Coordenador CEP/HCPA