

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO DE ÁREA DE REFERÊNCIA PARA
MATERIAL PARTICULADO INALÁVEL (MP_{2,5}) ASSOCIADO A
BIOMONITORAMENTO GENÉTICO EM CRIANÇAS**

Cristiane Silva da Silva

Porto Alegre, dezembro de 2013

**CARACTERIZAÇÃO DE ÁREA DE REFERÊNCIA PARA
MATERIAL PARTICULADO INALÁVEL (MP2,5) ASSOCIADO A
BIOMONITORAMENTO GENÉTICO EM CRIANÇAS**

Cristiane Silva da Silva

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

Orientadora: Dra. Vera Maria Ferrão Vargas

Comissão Examinadora

Prof. Dra. Teresinha Guerra

Dra. Clarice Torres de Lemos

Dra. Kelly Cristina Tagliari de Brito

Porto Alegre, dezembro de 2013

Agradecimentos

Expresso meus sinceros agradecimentos, como forma de reconhecimento, a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

Ao meu filho, Maurício, muito obrigada pelo apoio, pela confiança, por ter participado desta minha caminhada desde a graduação, e por ter compreendido o porquê de todo este envolvimento com estudo e com trabalho.

Aos meus pais, Adão e Eliane. Muito obrigada por terem me dado condições para chegar aqui, pois tudo isso foi iniciado há muito tempo por vocês, que sempre fizeram o melhor e apostaram em mim.

Ao Tobias Echle, que acompanhou parte do desenvolvimento do meu trabalho, sempre apoiando e incentivando.

À minha querida amiga Daniele Gervazoni. Sem teu apoio, companhia e amizade, nas diferentes dificuldades que enfrentamos, tudo teria sido muito mais difícil. Obrigada por tudo!

Aos amigos do IFRS – Câmpus Canoas, que me acompanharam desde o início, incentivando e sempre dispostos a ajudar.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Câmpus Canoas, por ter propiciado minha qualificação.

À Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Hoessler (FEPAM), por ter disponibilizado as condições necessárias para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e aos seus docentes e demais servidores.

À minha orientadora, Dra. Vera Maria Ferrão Vargas, incansável na busca de respostas para solucionar todas as questões que surgiam, pesquisadora exemplar e

comprometida. Agradeço por ter aceitado ser minha orientadora e por toda dedicação, compreensão e apoio.

À equipe de amostragem e aos demais funcionários da Divisão de Biologia da FEPAM.

À Prefeitura Municipal de Santo Antônio da Patrulha e às Secretarias de Educação e de Saúde deste município, por terem aceitado participar da pesquisa e disponibilizado servidores para auxiliar no trabalho. Um agradecimento especial às servidoras Nara e Magda e ao Sr. Daiçon Maciel da Silva, prefeito da cidade no início do trabalho, por ter permitido a instalação do amostrador de ar em sua residência.

Às equipes diretivas das escolas municipais Nercy Rosa, Santa Inês e Nossa Senhora de Fátima de Santo Antônio da Patrulha.

A todos os pequeninos e pequeninas, que aceitaram participar da pesquisa, com muita coragem, enfrentando agulhas para coleta de material. Foram bravos! Muito obrigada!

Às bolsistas Juliana Rossato e Aline Soares, que participaram em momentos diferentes, mas que contribuíram muito para a realização do trabalho. Vocês foram fundamentais.

À Jocelita, pela sua dedicação e comprometimento.

À Mariana Coronas, por todo o auxílio e por estar sempre à disposição para ajudar.

A todos os bolsistas do “Ames” e, também, às “meninas da citogenética”, que me auxiliaram sempre que eu necessitava, especialmente a Cris.

Resumo

As emissões veiculares e as atividades industriais, além de outras relacionadas ao crescimento da população humana, têm gerado uma grande variedade de compostos genotóxicos e/ou carcinogênicos, que podem ser liberados no ar e causar danos à saúde. Os níveis e os tipos de poluentes podem variar de acordo com a região. Entre os indicadores de poluição, as partículas finas inaláveis (MP2,5) podem atingir os alvéolos pulmonares e causar problemas respiratórios, especialmente em crianças, grupo mais sensível a substâncias tóxicas do que adultos. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi caracterizar área de referência para material particulado inalável (MP2,5), através de biomarcadores genéticos e dosagens de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), associados ao biomonitoramento genético de crianças. O trabalho foi realizado no município de Santo Antônio da Patrulha, RS, Brasil, área livre da pluma de dispersão de contaminantes industriais, classificada em estudos anteriores como área de referência. Os extratos orgânicos obtidos em nove *pools* de amostras foram avaliados quanto à mutagenicidade através do ensaio *Salmonella*/microsoma, método de microsusensão, com as linhagens TA98, TA100, YG1024 (em presença e ausência de metabolização) e YG1021 (sem metabolização). Os *pools* de amostras de ar foram quantificados quanto aos HPAs considerados poluentes prioritários. Para o biomonitoramento das 45 crianças avaliadas, foram utilizados os ensaios cometa em sangue periférico e micronúcleo (MN) em mucosa oral para medir lesões genômicas precoces. A concentração de MP2,5 no período, apresentou 9% (entre 25,89 e 64,71 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) de eventos acima do recomendado pela Organização Mundial de Saúde (25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Foram obtidos resultados, em revertentes/ m^3 , para a mutagênese, de negativos no período da primavera a $8,3 \pm 0,69$ no outono (-S9) e de negativos na primavera a $5,4 \pm 0,36$ no inverno (+S9) para a linhagem TA98. Os resultados

com as linhagens YG mostraram a presença de compostos nitrogenados com prevalência de mononitroarenos e aminas aromáticas. Entre os HPAs, o benzo(g,h,i)perileno apresentou a maior concentração em todas as amostras na área de estudo, seguido do indeno(1,2,3-cd)pireno (1,73 ng/m³ e 1,17 ng/m³, respectivamente). Em relação ao biomonitoramento das 45 crianças avaliadas, não houve correlação entre os parâmetros do ensaio cometa (momento, intensidade e comprimento da cauda) e os do teste do micronúcleo. Os valores observados para crianças em relação a estes biomarcadores foram: 0,27±0,407 para indução de MN em células bucais e 0,56±0,727 para brotos nucleares, 0,51±0,694 para células binucleadas, 46,37±16,330 para cromatina condensada, 6,97±5,746 para picnose, 6,60±5,540 para cariólise e 57,55±24,920 para cariorréxe, suas variantes celulares (%); para respostas ao ensaio cometa em relação ao comprimento da cauda (23,07±12,442), intensidade da cauda (7,28±11,657) e momento da cauda (0,95±2,30). A análise tanto para o teste do MN quanto para o ensaio cometa relacionada ao sexo e à idade não foi significativa. Entre os fatores de confusão, foram observadas diferenças significativas entre o fumo passivo e indução de MN. A presença de HPAs e a resposta mutagênica podem estar relacionadas às emissões veiculares locais. Estes resultados evidenciam a importância de se estudar áreas de referência para poluição atmosférica, estabelecendo níveis basais, principalmente em populações de crianças.

Palavras-chave: *Salmonella*/microssoma, HPAs, MP2,5, teste do micronúcleo, ensaio cometa

Abstract

Vehicular emissions and industrial activities and others involving the growth of the human population have caused a great variety of genotoxic and/or carcinogenic compounds, which may be released into the air and be harmful to health. The levels and types of pollutants may vary according to the region. Among the indicators of pollution fine inhalable particles (PM_{2.5}) can reach the pulmonary alveoli and cause respiratory problems, especially in children, a group that is more sensitive to toxic substances than adults. In this sense, the purpose of this study was to characterize an area of reference for inhalable particulate material (PM_{2.5}), through genetic biomarkers and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) dosages, associated with the genetic biomonitoring of children. It was performed in the city of Santo Antônio da Patrulha, RS, Brazil, an area that is free from the industrial pollutant contamination plume, classified in previous studies as an area of reference. The organic extracts obtained in nine pools of samples were evaluated for mutagenicity through the *Salmonella*/microsome assay, microsuspension method, with TA98, TA100, YG1024 (in the presence and absence of metabolization) and YG1021 (without metabolization). The pools of air samples were quantified as to the PAHs considered priority pollutants. In order to bio monitor the 45 children evaluated, the Comet assays in peripheral blood and micronucleus (MN) in oral mucosa were used to measure early genomic lesions. The concentration of PM_{2.5} during the period, obtained 9% (between 25.89 and 64.71 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) of the values above that recommended by the World Health Organization (25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Results were obtained in revertants/ m^3 , for the mutagenesis, of negatives during the spring to 8.3 ± 0.69 in autumn (-S9) and of negative in spring to 5.4 ± 0.36 in winter (+S9) for strain TA98. The results with strains YG showed the presence of nitrogenated compounds with a prevalence of mononitroarenes and aromatic

amines. Among the PAHs , benzo(g,h,i)perylene presented the highest concentration in all samples in the area of study followed by indeno(1,2,3-cd) pyrene (1.73 ng/m³ and 1.17 ng/m³, respectively). As to the biomonitoring of the 45 children evaluated there was no correlation between the parameters of the comet assay (moment, intensity and tail length) and the micronucleus test. The values reported for children concerning these biomarkers were: 0.27±0.407 for induction of MN in buccal cells and 0.56±0.727 for nuclear buds, 0.51±0.697 for binucleated cells, 46.37±16.330 for condensed chromatin, 6.97±5.746 for picnosis, 6.60±5.540 for caryolysis and 57.55±24.920 for caryorrhexis, its cellular variants (‰), and for responses to the Comet assay in relation to the tail length (23.07±12.442), intensity of the tail (7.28±11.657) and moment of the tail (0.95±2,30). The analysis both for the MN test and for the Comet assay regarding sex and age was not significant. Among the confounding factors, significant differences were observed for the passive smoking and induction of MN. The presence of PAHs and the mutagen response may be related to the local vehicular emissions. These results show the importance of studying areas of reference for atmospheric pollution, establishing baseline levels, especially in populations of children.

Key words: *Salmonella*/microsome, PAHs, PM2.5, micronucleus test, Comet assay

Lista de Abreviações

AZS	Azida Sódica
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
FEPAM	Fundação Estadual de Proteção Ambiental
HPA/PHA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos/ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
IARC	International Agency For Research On Cancer
MOE	Matéria Orgânica Extraída
MP2,5	Material Particulado Inalável Fino (<2,5 µm diâmetro aerodinâmico)
MP10	Material Particulado Inalável Grosso (<10 µm diâmetro aerodinâmico)
PTS	Partículas Totais em Suspensão (<100 µm diâmetro aerodinâmico)
S9	Sistema de metabolização P450 de mamíferos <i>in vitro</i> (fração S9- homogenato de células de fígado de rato Sprague-Dawley)
2AF	2 aminofluoreno
2NF	2 nitrofluoreno
4NQO	4-nitroquinolina-1-óxido

Sumário

1. Introdução.....	6
2. Artigo. Caracterização de área de referência para material particulado inalável (MP2,5) associado a biomonitoramento genético em crianças.....	20
Resumo	21
Introdução	23
Material e métodos	28
Área de estudo.....	28
Avaliação da atividade mutagênica do material particulado inalável.....	30
Coleta e extração de amostras.....	30
Caracterização de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	32
Ensaio <i>Salmonella</i> /microsossoma	33
Análise estatística.....	35
Biomonitoramento humano	35
Teste do micronúcleo	36
Ensaio cometa.....	37
Análise dos Dados.....	38
Resultados.....	39
Avaliação da atividade mutagênica do material particulado inalável	39
Concentrações de Material Particulado Inalável fino (MP2,5)	39
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	41
Ensaio <i>Salmonella</i> /microsossoma.....	43
Biomonitoramento humano.....	47
Ensaio do Micronúcleo e Cometa	47
Fatores de confusão da amostra: fumo passivo e doenças respiratórias	48

Análise dos Fatores de Confusão.....	49
Discussão.....	49
Poluição atmosférica: concentrações de HPAs e presença de mutagênese no material particulado MP2,5	51
Biomonitoramento genético em população de crianças.....	55
Análise dos fatores de confusão	58
Conclusões	58
Referências.....	61
3. Considerações finais	72
4. Referências.....	75
Apêndice A – Termo de Consentimento e Questionário.....	83
Apêndice B – Parecer do Comitê de Ética.....	96

Lista de Figuras

- Figura 1.** Localização do município de Santo Antônio da Patrulha, no estado do Rio Grande do Sul.....**29**
- Figura 2.** Concentração de MP_{2,5} no período amostrado. A Organização Mundial da Saúde recomenda média diária de 25 µg/m³. A variação na concentração foi de 2,03 µg/m³ a 64,71 µg/m³. Períodos de estudo: primavera (de 17 de setembro a 16 de dezembro de 2011), verão (de 22 de dezembro de 2011 a 15 de março de 2012), outono (21 de março a 19 de junho de 2012) e inverno (de 25 de junho a 30 de agosto de 2012). Em destaque, os valores acima do recomendado pela OMS e o menor valor encontrado na área de estudo.**40**
- Figura 3.** Concentração de HPAs nos extratos orgânicos do material particulado MP_{2,5} em Santo Antônio da Patrulha, RS em diferentes períodos de estudo. HPAs carcinogênicos dos grupos 1, 2A ou 2B (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluorantreno, benzo(k)fluorantreno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno e dibenzo(a,h)antraceno); demais HPAs: acenafteno, antraceno, benzo(g,h,i)perileno, fenantreno, fluorantreno e pireno (IARC, 2010).**43**
- Figura 4.** Atividade mutagênica dos extratos orgânicos atmosféricos (MP_{2,5}) avaliados pelo ensaio de microssuspensão em *Salmonella*/microssoma com a linhagem TA98 em presença e ausência de metabolização (S9), nos nove *pools* de amostras (1–6, primavera; 7, verão; 8, outono; 9, inverno) do município de Santo Antônio da Patrulha, RS. Controle negativo (DMSO): 43,7±15,19 revertentes/ placa (TA98-S9) e 32,8±12,37 revertentes/placa (TA98+S9); controles positivos (4NQO): 268±107,4 revertentes/placa (TA98-S9) e (2AF): 361,1±158,91 revertentes/placa (TA98+S9).**44**

Figura 5. Atividade mutagênica dos extratos orgânicos atmosféricos (MP2,5) avaliados pelo ensaio de microssuspensão em *Salmonella*/microsoma, com a linhagem TA100 em presença e ausência de metabolização (S9), nos *pools* de amostras de Santo Antônio da Patrulha, RS, no período da primavera. Controle negativo (DMSO): 231,5±79,19 revertentes/placa (TA100-S9) e 199,8±56,73 revertentes/placa (TA100+S9); controle positivo (AZS): 917,2±366,27 revertentes/placa (TA100-S9) e (2AF): 330±109 revertentes/placa (TA100+S9).**45**

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Organização e características dos *pools* obtidos na amostragem em Santo Antônio da Patrulha, RS, para a análise de mutagênese do ar.**31**
- Tabela 2.** Organização dos *pools* de amostras para análise dos HPAs por Cromatografia Acoplada a Espectrofotômetro de Massa.**33**
- Tabela 3.** Quantificação de HPAs na área de estudo obtida entre setembro de 2011 e agosto de 2012. As concentrações estão expressas em ng/m^3**42**
- Tabela 4.** Atividade mutagênica dos extratos orgânicos atmosféricos (MP2,5) avaliados pelo ensaio de microsusensão em *Salmonella*/microsoma, dos nove *pools* obtidos no município de Santo Antônio da Patrulha, RS, em revertentes/ μg**46**
- Tabela 5.** Descrição (média e desvio padrão) dos parâmetros investigados pelo ensaio cometa e teste do micronúcleo em mucosa bucal ($\%$), para a população de crianças investigadas em Santo Antônio da Patrulha, RS, e para os grupos de acordo com o sexo. **48**

1. Introdução

A poluição atmosférica vem crescendo devido ao aumento das atividades urbanas e industriais, à elevação da densidade de tráfego de veículos e a outras atividades inerentes ao crescimento da população humana (Janistcki *et al.*, 2009). Essas atividades geram uma diversidade de compostos químicos que podem ser liberados no ar.

O compartimento atmosférico não é um ambiente estável. Os produtos químicos emitidos a partir de uma fonte específica estão sujeitos a reações com compostos naturais da atmosfera, bem como com outros agentes emitidos por outras fontes, cujas interações podem levar à produção de compostos genotóxicos adicionais (Claxton & Woodall, 2007).

A Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) N.º 003 de 28, de junho de 1990, estabelece padrões primários e secundários de qualidade do ar para diversos parâmetros. As concentrações de poluentes atmosféricos em desacordo com os níveis estabelecidos poderão afetar a saúde, a segurança e o bem-estar da população, bem como ocasionar danos à flora e à fauna, aos materiais e ao meio ambiente em geral (Brasil, 1990). Entre estes parâmetros, as partículas em suspensão no ar são importantes indicadores de poluição ambiental. Seu potencial para causar problemas à saúde está diretamente relacionado ao tamanho, composição química e origem. Essas características determinam seu transporte e remoção no ar e a capacidade para penetrar e se depositar em diferentes áreas do sistema respiratório humano (De Martinis *et al.*, 1999; Vargas *et al.*, 2011; Brito *et al.*, 2013).

As Partículas Totais em Suspensão (PTS) apresentam diâmetro menor do que 100 μm ; as Partículas Inaláveis possuem diâmetro menor do que 10 μm , sendo subdivididas em partículas inaláveis grossas (MP10) com diâmetro entre 2,5-10 μm e as Partículas Inaláveis finas (MP2,5) com diâmetro inferior a 2,5 μm . Especialmente as MP2,5, encontradas na

fumaça do cigarro e também em gases produzidos pelas indústrias ou por automóveis, podem afetar os bronquíolos, interferindo na capacidade pulmonar respiratória (De Martinis *et al.*, 1999; Vargas *et al.*, 2011; Brito *et al.*, 2013).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda limites para a qualidade do ar baseados na concentração de partículas de diferentes diâmetros. Em relação à MP_{2,5}, a média diária é de 25 µg/m³ e a média anual é de 10 µg/m³ (WHO, 2006).

Vários compostos tais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) podem estar associados às micropartículas presentes no ar. Os HPAs são provenientes de processos de combustão, de atividades industriais e, especialmente, da queima incompleta de combustíveis automotivos (como diesel e gasolina). Estes compostos têm a capacidade de penetrar e se depositar nos alvéolos pulmonares, além de outras áreas do sistema respiratório, causando danos à saúde humana (Claxton *et al.*, 2004; Brito *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013). Apesar de não representarem a classe predominante dos agentes mutagênicos encontrados no material particulado do ar, os HPAs contribuem significativamente para a mutagenicidade (Claxton *et al.*, 2004; Coronas *et al.*, 2009).

A característica lipossolúvel dos HPAs permite uma rápida absorção, independente da rota de administração, pelos pulmões, intestinos e pele de animais experimentais. A biotransformação destes compostos envolve reações de oxidação, redução, hidrólise e conjugação que podem ser realizadas na mucosa nasal, oral e, principalmente, no fígado por enzimas do sistema de monooxigenases de função mista da família dos Citocromos P450, resultando em produtos eletrofílicos que reagem covalentemente com centros nucleofílicos do DNA, ou de outros compostos como proteínas, nos quais se ligam formando adutos. Esta formação no DNA, considerada essencial na carcinogenicidade química dos HPAs, pode implicar em efeitos mutagênicos, outros danos genéticos,

cardiovasculares e efeitos reprodutivos adversos (Akcha *et al.*, 2000; Lewtas, 2007; Meire *et al.*, 2007).

Com base em evidências epidemiológicas e experimentais de carcinogenicidade, entre outros dados relevantes, a IARC (*International Agency for Research on Cancer*) estabelece categorização (em grupos de 1 a 4) a vários tipos de agentes e misturas. A classificação de um agente ou uma mistura no grupo 1 ocorre quando há evidência suficiente de carcinogenicidade em seres humanos; no grupo 2 estão os classificados como provavelmente carcinogênicos para seres humanos (2A) ou como possivelmente carcinogênicos ao ser humano (2B); no grupo 3, há os não classificados como carcinogênicos a seres humanos e no grupo 4, os prováveis não carcinogênicos aos seres humanos. Um agente ou mistura é considerado provavelmente carcinogênico (2A) quando, apesar de haver evidência insuficiente de carcinogenicidade em humanos, há provas suficientes de carcinogenicidade em animais experimentais e uma forte evidência de que a carcinogênese é mediada por um mecanismo que também opera em seres humanos. A classificação como possivelmente carcinogênicos (2B) pode ser utilizada quando há inadequada evidência de carcinogenicidade em seres humanos e não há provas suficientes de carcinogenicidade em animais experimentais. Os não carcinogênicos a seres humanos (grupo 3) são aqueles compostos ou misturas cuja evidência de carcinogenicidade é inadequada em seres humanos e inadequada ou limitada em animais experimentais, enquanto os prováveis não carcinogênicos a seres humanos (grupo 4) não apresentam evidência suficiente de carcinogenicidade em seres humanos e carecem de indícios de carcinogenicidade em animais experimentais (IARC, 2010).

Em relação aos HPAs, o Órgão de Proteção Ambiental Americano (USEPA) considera 16 destes compostos como prioritários, sendo oito deles classificados como carcinogênicos ou potencialmente carcinogênicos: acenaftaleno, acenafteno, antraceno,

benzo(g,h,i)perileno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno e pireno (classificados no grupo 3); benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, criseno, indeno(1,2,3-cd)pireno e naftaleno (grupo 2B); dibenzo(a,h)antraceno (grupo 2A) e benzo(a)pireno, grupo 1 (IARC, 2010).

Pierce e Katz (1975) relataram um aumento potencial do efeito carcinogênico de compostos, tais como o benzo(a)pireno, devido a sua capacidade de adsorção a material particulado fino que pode penetrar no sistema respiratório e se depositar nos bronquíolos e alvéolos pulmonares. Entretanto, é necessário considerar que este composto é apenas um dos cancerígenos encontrados numa mistura de substâncias carcinogênicas presentes na atmosfera (Papageorgopoulou *et al.*, 1999; IARC, 2010).

Além dos HPAs, há também os seus derivados Hidrocarbonetos Aromáticos Nitropolicíclicos (Nitro-HPAs), mutagênicos ambientais persistentes que podem ser encontrados em partículas em suspensão no ar. Essas partículas também são derivadas da queima de combustíveis como gasolina e diesel ou, ainda, podem resultar de reações com outros produtos atmosféricos como radicais NO₂ e NO₃ (De Martinis *et al.*, 1999; Lewtas, 2007; Brito *et al.*, 2013).

A contaminação do compartimento atmosférico tem sido um dos maiores problemas ambientais, pois interfere na integridade dos ecossistemas e afeta a saúde humana (Vargas, 2003). Trabalhos envolvendo monitoramento genético podem auxiliar na detecção de danos causados à saúde humana e podem contribuir na identificação de processos carcinogênicos (Pereira *et al.*, 2013). Em relação ao câncer e a outras doenças causadas por mecanismos genotóxicos, os ensaios que medem genotoxicidade podem identificar produtos químicos, físicos, como radiação, e biológicos, como vírus, que causam mutações e danos cromossômicos. Alguns estudos epidemiológicos têm associado

exposição à poluição do ar com o desenvolvimento de câncer e outras doenças pulmonares e cardiovasculares (Vargas, 2003; Claxton & Woodall, 2007).

Dessa forma, os estudos de biomonitoramento genético têm se tornado cada vez mais necessários como consequência de uma crescente preocupação com os danos ambientais e com os efeitos causados à população humana potencialmente exposta. Uma estratégia importante é a utilização de biomarcadores genéticos sensíveis, tanto para avaliações populacionais como para a identificação da presença destas substâncias no material particulado do ar, constituindo-se ferramentas úteis para a avaliação precoce da exposição à poluição (Coronas *et al.*, 2009; Coronas, 2012; Pereira *et al.*, 2013).

A avaliação da atividade mutagênica, em diversas matrizes ambientais, incluindo o material particulado atmosférico, através do ensaio *Salmonella*/microsoma é amplamente utilizada (Claxton *et al.*, 2004). Este ensaio é padronizado e empregado mundialmente para detectar uma ampla gama de substâncias químicas que podem produzir danos genéticos (Mortelmans & Zeiger, 2000). Linhagens de *Salmonella typhimurium*, auxotróficas para histidina, apresentando mutações inseridas por engenharia genética no *operon* deste aminoácido, são incapazes de crescer em meio sem histidina, a menos que ocorram mutações reversas e a capacidade de sintetizar o aminoácido seja restaurada. Diversas linhagens foram projetadas para detectar uma ampla variedade de compostos.

Claxton *et al.* (2004), em revisão da literatura, ressaltam que estudos realizados na Ásia, Europa, América do Norte e América Latina têm analisado várias classes de partículas orgânicas mutagênicas, provenientes de fontes antropogênicas e produzidas a partir de reações químicas que ocorrem no ar. Os estudos em áreas urbanas nestes continentes têm indicado que muitos compostos mutagênicos presentes no ar, além de emissões industriais, têm origem da combustão de diesel e de gasolina dos automóveis,

além de outras fontes de combustão, tais como as emissões de aquecedores residenciais, de cinzas de carvão e da fumaça de cigarro.

No Brasil, há diversos trabalhos que fazem uso do Ensaio *Salmonella*/microsossoma para verificar a atividade mutagênica do material particulado atmosférico, dos quais se podem destacar alguns realizados no estado do Rio Grande do Sul, região Sul do Brasil. Em estudo desenvolvido em Porto Alegre, capital do estado, a análise da mutagênese em Partículas Totais em Suspensão (PTS) apresentou os valores mais elevados nos locais onde havia fluxo mais intenso de veículos automotores (Ducatti & Vargas, 2003; Vargas *et al.*, 1998; Vargas, 2003). Estudos realizados com material particulado MP2,5 mostraram resultados similares (Brito *et al.*, 2013). Pereira *et al.* (2010) realizaram estudo em dois municípios do estado, Montenegro (com atividade metalúrgica, indústrias têxteis e localizada em área de potencial influência do principal pólo petroquímico do Estado) e Santo Antônio da Patrulha (atividades agrícolas e pequenas destilarias), portanto, áreas urbanas sob diferentes fontes antrópicas analisando amostradores do tipo PTS. Observaram respostas mutagênicas em ambas as cidades, com valores mais elevados em Montenegro, relacionados às emissões veiculares e às atividades industriais, e menos elevados no município de Santo Antônio da Patrulha, relacionados ao trânsito de veículos locais. Coronas *et al.* (2009), realizaram estudo em área sob influência de refinaria de petróleo, também no estado do Rio Grande do Sul, no qual todas as amostras de material particulado MP10 mostraram resposta positiva e constante para a mutagenicidade a partir do ensaio *Salmonella*/microsossoma para todas as linhagens testadas.

Entre os biomarcadores genéticos para danos populacionais se destacam o ensaio cometa em sangue periférico e o teste do micronúcleo com células de mucosa bucal. São técnicas sensíveis para medir lesões genômicas precoces. A combinação destes dois biomarcadores possibilita definir uma ampla gama de danos genotóxicos e uma avaliação

mais precisa. O ensaio cometa pode fornecer informações sobre recentes níveis de exposição a substâncias genotóxicas em que parte dos danos ainda são passíveis de reparo (Pereira *et al.*, 2010). O teste do micronúcleo, por sua vez, fornece informações de danos cumulativos, tais como aneuploidias, quebras cromossômicas e modificações no comprimento dos telômeros (Holland *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2009).

O ensaio cometa é versátil, capaz de detectar danos primários no DNA e também sobre a capacidade da célula em reparar danos. O estudo de imagens permite analisar parâmetros como comprimento, momento e intensidade da cauda, sendo a intensidade (% de DNA) o parâmetro que cobre a mais ampla gama de danos e que está linearmente relacionado à frequência de quebras, e, portanto, o mais recomendado (Collins *et al.*, 2008). Segundo Burlinson *et al.* (2007), a intensidade da cauda é determinada pela porcentagem de DNA presente na cauda do cometa, enquanto o comprimento da cauda é obtido pela distância medida do meio da cabeça do cometa até o último ponto visível da cauda e o parâmetro momento da cauda é obtido pelo produto da quantidade de DNA na cauda e a distância média de migração de DNA na cauda.

O teste do micronúcleo pode ser usado como uma estratégia na identificação de danos em células vegetais, animais ou humanas, que foram expostas a substâncias mutagênicas ou carcinogênicas (Pereira *et al.*, 2013). Em estudos para avaliar população humana, pode ser realizado com células da mucosa bucal. Este teste é um método minimamente invasivo que informa sobre danos ao DNA, instabilidade cromossômica, morte celular e potencial regenerativo do tecido analisado. Considerando-se que cerca de 90% dos cânceres parecem ser de origem epitelial, a mucosa bucal pode ser utilizada para monitorar eventos genotóxicos precoces ocasionados por agentes carcinogênicos que podem ser introduzidos no organismo por meio de inalação ou de ingestão (Thomas *et al.*, 2009). Com base nos critérios de Tolbert *et al.* (1992), é possível classificar as células em

categorias que estabelecem a distinção entre células “normais” e células que são consideradas “anormais”, a partir de características citológicas e nucleares, que são indicadores de danos ao DNA, falhas citocinéticas ou morte celular.

Os tipos celulares analisados no teste do micronúcleo com mucosa bucal incluem as células basais, diferenciadas, diferenciadas com micronúcleo, diferenciadas com brotos nucleares, binucleadas, cromatina condensada, cariorréxe, picnose e cariólise. Ao comparar a célula basal com a diferenciada, observa-se que a diferenciada apresenta um tamanho maior e uma taxa nuclear menor no citoplasma, enquanto a célula basal é menor e tem uma taxa nuclear no citoplasma maior. A célula diferenciada micronucleada possui um núcleo principal e uma ou mais estruturas nucleares pequenas chamadas micronúcleos. Os micronúcleos podem ser redondos ou ovais e possuem diâmetro entre um terço e 1/16 do núcleo principal. A maioria das células com micronúcleo possui apenas um, porém, é possível encontrar células com dois ou mais MN em indivíduos que foram expostos à radiação ou a outros agentes genotóxicos. Nas células diferenciadas com brotos nucleares, o núcleo principal contém uma forte constrição, formando um broto, que permanece ligado ao núcleo principal e que apresenta similar intensidade de coloração, contudo, seu tamanho pode variar de metade a um quarto do diâmetro do núcleo principal. As células binucleadas contêm dois núcleos principais, com tamanho e intensidade de coloração similares. Nas células com cromatina condensada observa-se um padrão nuclear estriado, no qual a cromatina agregada está intensamente corada. As células do tipo cariorréxe apresentam uma agregação da cromatina mais extensa do que as células bucais com cromatina condensada, porém, com um padrão nuclear de pontos mais densos que outros, apresentando indicativos de fragmentação nuclear que pode levar a uma desintegração do núcleo. As células do tipo picnose possuem um núcleo uniformemente e intensamente corado, com diâmetro variando entre um terço e dois terços do diâmetro de um núcleo

normal. Nas células do tipo cariólise o núcleo é completamente desprovido de DNA, representando um estágio final de morte celular (Thomas *et al.*, 2009).

O teste do micronúcleo tem sido utilizado como um biomarcador de danos no DNA (observado na presença de células com micronúcleo e ou com brotos nucleares), de defeitos na citocinese (presença de células binucleadas), de potencial proliferativo (considerando a frequência de células basais) e ou de morte celular (no caso de células com cromatina condensada, cariorréxe, picnose e cariólise) (Thomas *et al.*, 2009).

Estes ensaios têm sido empregados para estudos de exposição ocupacional (Roma-Torres *et al.*, 2006) e ambiental, em especial referente à poluição do ar (Binkova *et al.*, 1996; Valverde *et al.*, 1997; Sram *et al.*, 1998; Vinies & Husgafvel-Pursiainen, 2005).

A partir do exposto, pode-se considerar que a utilização de biomarcadores aliados à caracterização química do material particulado atmosférico e suas fontes de emissão auxiliam no melhor entendimento dos efeitos dos poluentes biologicamente ativos bem como na escolha de padrões atmosféricos mais apropriados à segurança da saúde humana (Vargas *et al.*, 2011).

No Brasil, por exemplo, pode-se destacar os trabalhos desenvolvidos no Rio Grande do Sul. Coronas *et al.* (2009) realizaram estudo de biomonitoramento genético avaliando efeitos genotóxicos em humanos (homens adultos) que residiam e/ou trabalhavam próximos e na principal rota de dispersão de material particulado atmosférico de uma refinaria de petróleo, utilizando o teste do micronúcleo em mucosa bucal e o ensaio cometa em linfócitos de sangue periférico. Ao comparar dados deste trabalho com estudo realizado em Santo Antônio da Patrulha, município considerado referência, as pessoas expostas mostraram aumento significativo nos danos ao DNA detectados pelo ensaio cometa. Já Pereira (2008) e Pereira *et al.* (2013) analisaram os efeitos genotóxicos e mutagênicos em pessoas expostas à material particulado do ar, em municípios também

sujeitos à influência de indústria petroquímica (Montenegro e Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil), entre outras fontes antropogênicas, utilizando os mesmos biomarcadores e município referência. Evidenciaram diferenças significativas quanto à indução de MN em células bucais no município de Rio Grande. No entanto, não foram obtidos valores significativos para esses biomarcadores no município de Montenegro distante 22 km de polo industrial petroquímico.

Estudos epidemiológicos moleculares têm evidenciado que as crianças podem ser mais suscetíveis a substâncias tóxicas, incluindo agentes cancerígenos, do que os adultos. Essa exposição pode ocorrer por diversas vias (através de inalação, de ingestão ou de absorção dérmica), podendo ter início durante o período pré-natal e ocorrer em todos os estágios de desenvolvimento do indivíduo (Neri *et al.*, 2006a).

Entre os efeitos adversos para a saúde que poderiam ser estudados em crianças expostas, os danos citogenéticos recebem atenção especial, uma vez que uma alta frequência de alterações no DNA, ou no cromossomo, é preditiva de câncer em adultos saudáveis (Gallo *et al.*, 2008; Gajski *et al.*, 2013). Diferenças entre crianças e adultos, no que se refere à exposição de substâncias tóxicas, podem resultar de uma combinação entre toxicocinética, toxicodinâmica e fatores de exposição. A vulnerabilidade específica pode estar relacionada com o desenvolvimento e maturação de órgãos, como, por exemplo, cérebro, ossos e sistema endócrino (Schwenk *et al.*, 2003).

A OMS ressalta que as crianças têm uma vulnerabilidade excepcional a riscos ambientais tanto para efeitos crônicos quanto para agudos em comparação a adultos. As crianças são relativamente mais expostas a doses exógenas de toxinas ambientais, ou seja, a absorção é aumentada em comparação com adultos. Isto pode ser atribuído tanto ao estilo de vida quanto à fisiologia. Além disso, mesmo que a exposição a uma toxina exógena seja semelhante em crianças e adultos, pode haver diferenças na quantidade que atingirá o

órgão-alvo e na capacidade deste em proteger-se. Por fim, se a exposição começa na infância, até o indivíduo atingir a idade adulta, haverá tempo suficiente para que a exposição se torne crônica e para que ocorra a manifestação de efeitos adversos à saúde, mesmo para doenças com uma longa latência, como o câncer (Wild & Kleinjans, 2003).

Em trabalho de biomonitoramento de crianças saudáveis, realizado na Croácia, envolvendo ensaio cometa e teste do micronúcleo em linfócitos, Gajski *et al.* (2013) ressaltaram a importância do uso de ambos os ensaios na avaliação de danos citogenéticos, especialmente em crianças. Apesar de o biomonitoramento requerer a aplicação de baterias de diferentes biomarcadores, estes testes ainda são amplamente utilizados como métodos de escolha para avaliação de genotoxicidade devido a sua acessibilidade e eficiência (Gajski *et al.*, 2013). A abordagem utilizando a análise de micronúcleos em células de mucosa oral combina a utilização deste biomarcador recomendado de forma não invasiva.

Diversos estudos têm demonstrado aumento de riscos à saúde de populações de crianças expostas a altos níveis de poluentes do ar potencialmente carcinogênicos, comparado às populações que vivem em áreas consideradas relativamente limpas (Salvi, 2007; Ruchirawat *et al.*, 2007; Sisenando *et al.*, 2012). Salvi (2007), por exemplo, relata trabalho realizado com crianças, comparando as que vivem em uma cidade com altos níveis de poluentes no ar (Cidade do México) com aquelas que vivem em uma cidade relativamente limpa (Veracruz), ambas no México, mostrando que há diferença significativa entre os dois grupos em relação a mudanças estruturais na mucosa nasal de crianças expostas a poluentes, que pode estar associada a maior sensibilidade a partículas finas, levando a um aumento no risco a doenças respiratórias crônicas e a decréscimo da função pulmonar em crianças com elevada exposição.

Ruchirawat *et al.* (2007) avaliaram a exposição de crianças em escolas localizadas em Bangkok, Tailândia, cuja exposição a HPAs era 3,5 vezes maior do que a das crianças

em escolas de áreas rurais, mostrando que crianças que vivem em grandes cidades podem ter um risco aumentado para o desenvolvimento de doenças devido à exposição a substâncias genotóxicas presentes no ar comparado a crianças que vivem em áreas suburbanas/ rurais.

Revisão da literatura realizada por Neri *et al.* (2006b) mostra que há níveis diferentes nos resultados encontrados para o ensaio cometa em estudos de exposição à poluição do ar em várias partes do mundo, como República Tcheca, México e Bélgica, em população de crianças (0-18 anos). É importante destacar que, nas áreas de referência desses estudos, observa-se uma variação nos valores médios de danos na ordem de $0,33 \pm 0,03$ (Bélgica) à $41,7 \pm 3,40$ (México). Bonassi *et al.* (2011), por sua vez, após a análise de dados sobre frequência de micronúcleos em mucosa oral de diferentes partes do mundo, incluindo Índia, Brasil, Cuba, México, Estados Unidos da América, Alemanha, Itália e outros países da Europa, identificaram como um intervalo adequado para áreas de referência de 0,32–1,70 ‰, o que pode ser considerado como uma ocorrência natural para células micronucleadas em testes com células bucais esfoliadas.

Portanto, a avaliação de áreas consideradas de referência para a identificação de níveis basais de exposição a agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos relacionados à exposição a poluentes do ar, é um fator importante, pois permite a mensuração de danos que podem elevar os riscos à saúde da população humana. Segundo Huen *et al.* (2006), muitos estudos sobre poluição do ar têm envolvido a comparação entre populações que residem em áreas com elevados níveis de poluição do ar e as que residem em áreas de referência (com baixos níveis de poluentes ambientais). Ainda, de acordo com Bonassi *et al.* (2011), a identificação de valores de áreas de referência é importante para que sejam formados bancos de dados que poderão ser utilizados para calibração e/ou comparação em estudos futuros.

Em estudos de biomonitoramento genético de populações, incluindo crianças, abordagens regionais são importantes, uma vez que as diferenças em padrões de exposição dependem da região, cidade ou país, além de fatores como níveis de exposição ao tráfego, hábitos alimentares, estilo de vida, condições sociais, econômicas, etnia e suscetibilidade genética, que podem modificar o impacto associado a um determinado fator de risco (Neri *et al.*, 2006a). Pelo exposto, fica evidente a importância de se identificar valores referenciais no Brasil para danos em crianças e adultos. Pereira *et al.* (2013) em trabalho realizado no município de Santo Antônio da Patrulha, com população de adultos, consideraram este município como referência para poluição do ar no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Com relação a estudos em crianças no Brasil, existem poucos relatos na literatura, podendo-se citar o trabalho realizado por Sisenando *et al.* (2012) na região amazônica, que mostrou diferenças significativas na frequência de micronúcleos em crianças expostas a áreas com queima de biomassa em relação às crianças da área considerada de referência. Coronas (2012), no sul do Brasil, investigou população de crianças em área influenciada por solo contaminado por uma usina de tratamento de madeira, cujo resultado não apresentou diferenças significativas para micronúcleo em mucosa bucal e para o teste cometa em sangue periférico, avaliados entre o grupo de risco e o grupo referência.

Neste contexto, o presente estudo objetivou realizar biomonitoramento genético de crianças em área urbana considerada de referência para agentes mutagênicos adsorvidos a material particulado inalável. Foram avaliados, por meio de ensaio *Salmonella*/microsoma, os níveis de mutagênese em extratos orgânicos de MP2,5 como marcador de exposição ambiental e utilizados biomarcadores genéticos que permitiram definir sinais precoces de exposição a agentes mutagênicos.

Este trabalho resultou na preparação de um artigo científico que relata o potencial mutagênico de material particulado inalável (MP2,5) em área considerada de referência, associada a biomonitoramento humano em população de crianças, através de biomarcadores genéticos moleculares.

A Agência Internacional para Estudos do Câncer (IARC) classificou, recentemente, a poluição do ar como carcinogênico humano (Grupo 1). Alerta que o sistema respiratório, especialmente os pulmões, recebe doses diárias de contaminantes do ar, em maior ou menor concentração, provenientes de diferentes fontes, tais como fumo, queima de combustíveis para aquecimento, cozimento, geração de energia e processos industriais, além de emissões veiculares, perigosas mesmo quando presentes em concentrações baixas e aparentemente triviais (IARC, 2013).

Apesar deste anúncio, no artigo resultante deste estudo, foram mantidos os critérios estabelecidos pela OMS até o momento para MP2,5 (média diária de $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$), uma vez que ainda não houve modificação nos limites estabelecidos.

2. Artigo

Caracterização de área de referência para material particulado inalável (MP2,5) associado a biomonitoramento genético em crianças

Cristiane Silva da Silva ^{a,b,1}, Juliana Marzari Rossato ^b, Jocelita Aparecida Vaz Rocha ^b,
Vera Maria Ferrão Vargas ^{a,b*}

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

^bPrograma de Pesquisas Ambientais, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM), Avenida Salvador França, 1707 CEP: 90690-000 Porto Alegre, RS, Brasil.

Artigo a ser submetido à *Mutation Research*.

*Autor para correspondência: Programa de Pesquisas Ambientais, Divisão de Biologia, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM), Avenida Salvador França, 1707 CEP: 90690-000, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel.: +55 51 33346765; fax: +55 51 33346765. ecorisco@fepam.rs.gov.br

¹ Presente endereço: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – Câmpus Canoas, Rua Dra Maria Zélia Carneiro de Figueiredo, 870, 92412-840, Canoas, RS Brasil. cristiane.silva@canoas.ifrs.edu.br.

Resumo

A população humana está exposta a poluentes atmosféricos que podem causar danos à saúde, especialmente às crianças, mais sensíveis a agentes tóxicos, incluindo cancerígenos. Objetivou-se, neste estudo, caracterizar área de referência para material particulado inalável (MP2,5) através da caracterização química (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) e mutagênica de MP2,5 associada ao biomonitoramento genético de crianças (setembro/2011 – agosto/2012). A área de estudo foi o município de Santo Antônio da Patrulha, RS, Brasil, considerada como referência em estudos prévios. A matéria orgânica (extraída com diclorometano) de MP2,5 foi avaliada quanto à mutagênese no ensaio *Salmonella*/microsoma (microsuspensão), nas linhagens que medem erro no quadro de leitura (TA98, YG1021 e YG1024) e substituição de pares de bases (TA100) do DNA, na presença e ausência de fração de metabolização de fígado de rato (S9). Para estudo de exposição foi analisada uma amostra populacional de crianças através dos ensaios cometa (linfócitos de sangue periférico) e micronúcleo (células esfoliadas de mucosa oral). A concentração de MP2,5 no período apresentou 9% (25,89 – 64,71 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) de eventos acima valor limite recomendado pela Organização Mundial de Saúde (25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Respostas para mutagênese (revertentes/ m^3) variaram de negativas na primavera a $8,3 \pm 0,69$ no outono (-S9) e $5,4 \pm 0,36$ no inverno (+S9), na linhagem TA98, e para TA100, na primavera, de negativos a $14,8 \pm 4,23$ (-S9) e $17,5 \pm 2,72$ (+S9). Resultados com linhagens YG mostraram prevalência de mononitroarenos e aminas aromáticas. No biomonitoramento (45 crianças) foi possível estabelecer como valores médios para MN, $0,27 \pm 0,407$ (‰) e para os demais tipos celulares uma variação de $0,56 \pm 0,727$ (‰), brotos nucleares, a $57,55 \pm 24,920$ (‰), cariorréxe. Para o ensaio cometa, as médias foram $23,07 \pm 12,442$; $7,28 \pm 11,657$ e $0,95 \pm 2,302$ para comprimento, intensidade e momento da cauda, respectivamente. Não

houve diferença sexual nem por idade para os diferentes parâmetros. Entre fatores de confusão, observou-se diferença significativa para fumo passivo e indução de MN. A presença de HPAs e mutagênese no ar pode estar relacionada às emissões veiculares locais. Estes resultados evidenciaram a importância de estudos em áreas de referência para poluição atmosférica associados a biomonitoramento humano, visando estabelecer níveis basais de exposição, principalmente em crianças, considerando variações regionais.

Palavras-chave: *Salmonella*/microsoma, MP2,5, teste do micronúcleo, ensaio cometa; exposição de crianças; áreas de referência.

1. Introdução

Uma das consequências da crescente urbanização, acompanhada do aumento das atividades industriais e da densidade de tráfego de veículos automotores, é a produção de agentes genotóxicos que, uma vez liberados no compartimento atmosférico, podem se combinar com outros compostos presentes no ar (naturais ou de fontes adversas), causando danos à saúde humana (Vargas, 2003; Claxton & Woodall, 2007; Iancu *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2010; Brito *et al.*, 2013).

Entre os indicadores de poluição ambiental, destacam-se as partículas em suspensão, que variam em diâmetro e composição química, podendo adsorver substâncias perigosas à saúde como compostos orgânicos e metais pesados. As partículas inaláveis finas, com diâmetro menor do que 2,5 μm (MP2,5), podem afetar os bronquíolos e causar problemas pulmonares. Essas partículas são provenientes da fumaça do cigarro e também produzidas por emissões industriais e veiculares (De Martinis *et al.*, 1999; Vargas, 2003; Vargas *et al.*, 2011; Brito *et al.*, 2013). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda limites de 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ diários de MP2,5 (WHO, 2006). No entanto, a Agência Internacional para Estudos do Câncer alertou recentemente que a poluição do ar deve ser considerada cancerígena (grupo 1) (IARC, 2013). A OMS informa a necessidade de revisão dos limites vigentes para emissões de poluentes no ar uma vez que efeitos à saúde têm ocorrido, em alguns casos, em concentrações menores de poluentes do ar do que aquelas estabelecidas como limites (WHO, 2013).

Devido a sua genotoxicidade e/ou carcinogenicidade, os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs), produzidos pela combustão incompleta de material orgânico, tais como incêndios florestais, de campos e de combustíveis fósseis, são considerados

poluentes orgânicos prioritários em estudos ambientais, conhecidos como precursores de ações mutagênicas em sistemas biológicos (Shannigrahi *et al.*, 2005; Meire *et al.*, 2007).

Além dos HPAs, outros compostos orgânicos de origem antropogênica podem ser encontrados nas partículas atmosféricas em suspensão. Entre estes, há os Hidrocarbonetos Aromáticos Nitropolicíclicos (nitro-HPAs), formados quando os HPAs se combinam com óxidos nitrogenados. São compostos com propriedades mutagênicas e carcinogênicas, de grande persistência no ambiente (Kakimoto *et al.*, 2002; De Marini *et al.*, 2004).

Em revisão da literatura, Claxton *et al.* (2004) ressaltaram que estudos realizados na Ásia, Europa, América do Norte e América Latina têm analisado várias classes de partículas orgânicas mutagênicas, provenientes de fontes antropogênicas e produzidas a partir de reações químicas que ocorrem no ar. Além das emissões industriais, os estudos em áreas urbanas têm indicado que muitos compostos mutagênicos presentes no ar, nestes continentes, têm origem da combustão de diesel e de gasolina dos automóveis, além de outras fontes de combustão, tais como as emissões de aquecedores residenciais, de cinzas de carvão e da fumaça de cigarro.

Em municípios do estado do Rio Grande do Sul, localizados na região sul do Brasil, foram relatados estudos em áreas urbanas e industriais, sob a influência de diferentes fontes antrópicas, com maior ou menor impacto quanto à presença de agentes genotóxicos. Estes estudos mostraram resultados significativos em relação à mutagenicidade do material particulado atmosférico, sendo os maiores valores registrados em locais onde havia a influência de emissões veiculares e de atividades antropogênicas industriais (Ducatti & Vargas, 2003; Vargas, 2003; Coronas *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2010; Lemos *et al.*, 2012; Brito *et al.*, 2013).

Neste contexto, estudos envolvendo monitoramento genético podem auxiliar na detecção de danos causados à saúde humana (Pereira *et al.*, 2013). A utilização de

biomarcadores genéticos sensíveis, tanto para avaliações populacionais como para a identificação da presença destas substâncias no material particulado do ar, constituem ferramentas úteis para a avaliação precoce da exposição humana à poluição atmosférica (Vargas, 2003; Coronas *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2010; Brito *et al.*, 2013). Para avaliar a atividade mutagênica do material particulado atmosférico, o ensaio *Salmonella*/microssoma, padronizado e amplamente utilizado, permite a detecção de uma ampla gama de substâncias químicas que podem produzir danos genéticos (Mortelmans & Zeiger, 2000; Vargas, 2003; Claxton *et al.*, 2004; Brito *et al.*, 2013).

Adicionalmente, para mensurar danos populacionais se destacam o teste do micronúcleo com células esfoliadas de mucosa bucal e o ensaio cometa em sangue periférico. O ensaio cometa pode fornecer informações sobre exposição recente a substâncias genotóxicas em que parte dos danos ainda são passíveis de reparo. Este ensaio pode detectar além de quebras de fita simples e dupla no DNA, lesões em sítio alcali-lábeis e reparo incompleto dos sítios de excisão (Singh *et al.*, 1988; 2000). Já o teste do micronúcleo pode fornecer informações de danos cumulativos, tais como aneuploidias, quebras cromossômicas e modificações no comprimento dos telômeros (Fenech *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2010; Holland *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2009).

A aplicação do biomonitoramento humano vem crescendo nos últimos anos e tem se tornado importante na avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos sobre a saúde humana. O ensaio do micronúcleo em células bucais tem sido utilizado para o monitoramento de danos genéticos tanto em estudos populacionais (Heuser *et al.*, 2007) quanto de exposição ocupacional da população humana (Karahalil *et al.*, 1999; Majer *et al.*, 2001). O ensaio do cometa vem sendo aplicado na avaliação da exposição ocupacional ou a compostos específicos, além de exposição ambiental (Binkova *et al.*, 1996; Valverde *et al.*, 1997). Trabalhos realizados no Rio Grande do Sul, Brasil, mostraram aumento

significativo de danos ao DNA em homens adultos potencialmente expostos a poluentes atmosféricos de origem petroquímica quando comparados a homens adultos oriundos de área considerada de referência (Pereira, 2008; Coronas *et al.*, 2009).

Estudos epidemiológicos moleculares têm evidenciado que as crianças podem ser mais suscetíveis a substâncias tóxicas, incluindo agentes cancerígenos, do que os adultos (Neri *et al.*, 2006a). Isto se deve, principalmente, ao fato de que as crianças são mais sensíveis aos efeitos dessa exposição (Gajski *et al.*, 2013). De acordo com a OMS, as crianças têm uma vulnerabilidade excepcional a riscos ambientais tanto para efeitos crônicos quanto para agudos em comparação a adultos. Além das diferenças fisiológicas e comportamentais da população infantil, há outros fatores que podem contribuir na identificação de riscos específicos para a população em geral, envolvendo diferenças regionais, como por exemplo, níveis de exposição a tráfego veicular, dieta, estilo de vida, condições sociais, econômicas, etnia e suscetibilidade genética (Neri *et al.*, 2006a).

Crianças que vivem em grandes cidades, expostas a concentração mais elevada de poluentes do ar potencialmente carcinogênicos, têm apresentado aumento no risco a doenças respiratórias crônicas, comparadas com crianças que vivem em áreas suburbanas/rurais, consideradas relativamente limpas (Salvi, 2007; Ruchirawat *et al.*, 2007). Sánchez-Guerra *et al.* (2012), por exemplo, relataram que crianças que vivem próximas a áreas de indústria petroquímica estão mais expostas a altos níveis de HPAs, o que pode aumentar os riscos à saúde.

Estudos realizados com biomonitoramento genético em crianças no México (Calderon-Guarciduenas *et al.*, 1997) e na Rússia (Pelevina *et al.*, 2001), compararam as que viviam em áreas poluídas com as que viviam em áreas de referência (baixos níveis de poluentes atmosféricos), mostrando que a poluição do ar pode afetar a estabilidade genômica e potencialmente causar câncer em crianças. Huen *et al.*, (2006) conduziram

estudo, envolvendo crianças e adultos, para avaliar danos cromossômicos através do teste micronúcleo em mucosa oral, sugerindo maior vulnerabilidade em crianças à poluição do ar relacionada ao tráfego. No Brasil, Sisenando *et al.* (2012) realizaram trabalho na região amazônica mostrando diferenças significativas na frequência de micronúcleos em crianças expostas a áreas com queima de biomassa em relação à área considerada de referência. No estudo realizado por Coronas (2012), com crianças, no sul do Brasil, não foram observadas diferenças significativas para micronúcleo em mucosa bucal e cometa em sangue periférico avaliados entre o grupo de risco, sob a influência de contaminação do solo gerada por uma usina de tratamento de madeira, e o grupo referência.

Desta forma, na comparação entre populações potencialmente expostas a poluentes do ar e populações que residem em áreas consideradas de referência, torna-se cada vez mais necessária a avaliação em áreas com baixos níveis de poluentes ambientais, a fim de se estabelecer os efeitos em níveis basais de exposição e de formar bancos de dados que poderão ser utilizados para calibração e/ou comparação em estudos populacionais futuros (Bonassi *et al.*, 2011). Especialmente em estudos relacionados a crianças, conforme relatam Neri *et al.* (2006a), mas também aplicáveis a população adulta, são importantes avaliações regionais devido às diferentes formas de exposição, seja ao nível da região onde vivem, na cidade ou no país. No Brasil, estudos envolvendo adultos, em área de referência para poluição do ar, realizados por Coronas *et al.* (2009) e Pereira *et al.* (2013), verificaram, no município de Santo Antônio da Patrulha, Rio Grande do Sul, Brasil, resultados de negativos a mínimos, em relação à mutagenicidade de partículas totais em suspensão (PTS), bem como níveis de genotoxicidade no ensaio cometa e micronúcleo comparados a áreas de exposição a poluentes do ar de origem petroquímica.

Considerando os aspectos destacados anteriormente, o presente estudo teve como objetivo analisar o potencial mutagênico do material particulado inalável (MP2,5) em área

considerada de referência no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, associado ao biomonitoramento humano em população de crianças, através de biomarcadores genéticos moleculares.

2. Material e métodos

2.1 Área de estudo

A pesquisa foi realizada no município de Santo Antônio da Patrulha (29° 49' 04" S 50° 31' 12" O), região metropolitana de Porto Alegre, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Figura1). O município ocupa uma área de 1.048,904 km², tem uma população de 41.579 habitantes, com uma densidade de 37,8 hab./km², altitude 131 m e distância de 73 km da capital do estado (IBGE, 2013). Pereira *et al.* (2010; 2013) definiram este município como área de referência para estudos de investigação de contaminantes atmosféricos genotóxicos, envolvendo Partículas Totais em Suspensão (PTS) e biomonitoramento genético, em população humana adulta. Localiza-se em área distante de grandes centros urbanos e industriais e fora da pluma de dispersão de poluentes atmosféricos de origem industrial. Possui pequenas propriedades rurais agrícolas ou pecuárias e se destaca como principal produtora de cachaça.

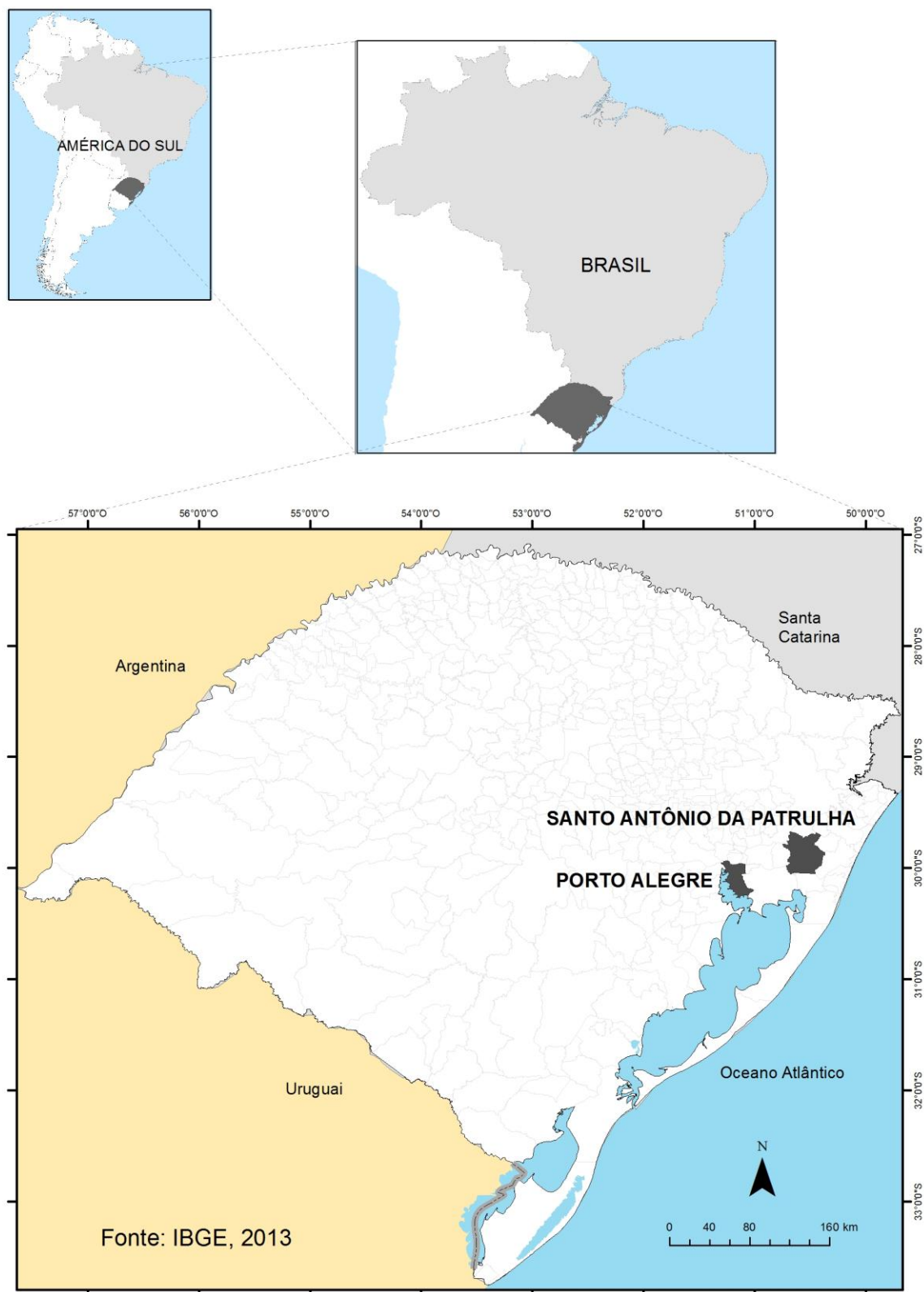


Figura 1. Localização do município de Santo Antônio da Patrulha, no estado do Rio Grande do Sul.

2.2 Avaliação da atividade mutagênica do material particulado inalável

2.2.1 Coleta e extração de amostras

O amostrador de ar foi instalado em área distante de fluxo contínuo de veículos, obedecendo ao distanciamento de, no mínimo, 20 m de árvores, edifícios e demais obstruções que impossibilitassem o fluxo de ar ao redor do equipamento (ABNT, 1988). Foram coletadas amostras de partículas inaláveis em filtros (EE55, 8x10, 20,3 x 25,4 cm) utilizando um amostrador de grandes volumes de ar para partículas de até 2,5 μm , AVG MP2,5, modelo 1200/CCV, por período de 24 horas, (ABNT, 1988), entre setembro de 2011 e agosto de 2012. A cada semana foi coletado um filtro. Após as coletas, as amostras foram submetidas à extração com solvente diclorometano (DCM, CASRN 75-09-2) pela técnica de ultrassom (Vargas *et al.*, 1998), visando extrair compostos moderadamente polares, onde se encontra a maior fração dos compostos orgânicos mutagênicos (Claxton *et al.*, 2004).

Com os filtros coletados foram preparados nove *pools* de amostras para posterior análise, reunidos como descrito na Tabela 1. Os *pools* 1, 2, 3, 4, 5 e 6, caracterizaram o período da primavera, enquanto os *pools* 7, 8 e 9, caracterizaram as estações verão, outono e inverno, respectivamente. O primeiro *pool* (1) foi formado por filtros obtidos anteriormente à fase de coleta de material biológico para o biomonitoramento humano, enquanto os *pools* 2, 3, 4, 5 e 6 continham filtros coletados em período concomitante a esta fase. Os filtros que formaram os *pools* 7, 8 e 9 foram coletados em períodos posteriores ao do biomonitoramento (Tabela 1).

Tabela 1. Organização e características dos *pools* obtidos na amostragem em Santo Antônio da Patrulha, RS, para a análise de mutagênese do ar.

<i>Pools</i> ¹	Data da coleta	Número de filtros	Fase do biomonitoramento humano	Estação
1	17, 23 e 29 de setembro/2011	3	Anterior	Primavera
2	05 e 11 de outubro/2011	2	Concomitante	
3	17 e 23 de outubro/2011	2		
4	29 de outubro e 04 de novembro/2011	2		
5	10 e 16 de novembro/2011	2		
6	22 e 28 de novembro/2011	2		
7	22 e 28 de dezembro/2011; 03, 09, 21 e 27 de janeiro/2012; 02, 08, 14 e 20 de fevereiro/2012; 03, 09, 15 de março/2012	13	Posterior	Verão
8	21 e 27 de março/2012; 21 e 26 de abril/2012; 02, 08, 14, 20 e 26 de maio/2012; 01, 07, 13 e 19 de junho/2012	13		Outono
9	25 de junho/2012; 01, 07, 13, 19 e 25 de julho/2012; 06, 12, 18, 24 e 30 de agosto/2012	11		Inverno

¹O *pool* 1 foi obtido em setembro de 2011, antes da coleta de material para ensaios de biomonitoramento humano, enquanto os *pools* 2 a 6 foram obtidos em consonância com este período e caracterizam a primavera. Os demais *pools* caracterizam a mutagênese nas estações verão (7), outono (8) e inverno (9).

2.2.2 Caracterização de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

Os extratos orgânicos de MP2,5 foram analisados por Cromatografia Acoplada a Espectrofotômetro de Massa quanto aos 16 HPAs considerados prioritários pela USEPA: acenaftaleno, acenafteno, antraceno, benzo(g,h,i)perileno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno e pireno, classificados no grupo 3 (não classificado como carcinogênico em seres humanos); benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, criseno, indeno(1,2,3-cd)pireno e naftaleno, grupo 2B (possível carcinogênico ao ser humano); dibenzo(a,h)antraceno, grupo 2A (provável carcinogênico ao ser humano) e benzo(a)pireno, grupo 1 (carcinogênico para o ser humano) (IARC, 2010).

Para essa análise, os *pools* foram organizados da seguinte forma: o *pool* 1 foi analisado separadamente, pois foi obtido na fase anterior ao biomonitoramento (amostra P1); os *pools* 2, 4, 5 e 6 (primavera) foram agrupados, possibilitando uma análise do período concomitante ao biomonitoramento (amostra P2a); o *pool* 3 (primavera), também concomitante ao biomonitoramento, além de ter sido amostrado em período em que houve um episódio de explosão do vulcão Puyehue, Chile (CLIMATEMPO, 2011; METSUL, 2011) apresentou filtro com a maior concentração de MP2,5 (64,71 μm^3), também foi analisado separadamente (amostra P2b); análise dos *pools* 7 (amostra V), 8 (amostra O) e 9 (amostra I) para caracterizar o período posterior ao biomonitoramento, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Organização dos *pools* de amostras para análise dos HPAs por Cromatografia Acoplada a Espectrofotômetro de Massa.

<i>Pools</i> ¹	Amostras para análise dos HPAs	Estação
1	P1	
2		
4	P2a	Primavera
5		
6		
3	P2b	
7	V	Verão
8	O	Outono
9	I	Inverno

¹*Pools* obtidos no período de amostragem (entre setembro de 2011 e agosto de 2012) para análise de mutagênese do ar no local de estudo.

2.3 Ensaio *Salmonella*/microsoma

A detecção de substâncias mutagênicas foi obtida a partir do teste *Salmonella*/microsoma, ou Teste de Ames (Maron & Ames, 1983), através do método de microsuspendência (Kado *et al.*, 1986).

O ensaio *Salmonella*/microsoma, ou Teste de Ames, detecta uma ampla gama de substâncias químicas, entre as quais novos produtos químicos e drogas, que podem produzir mutações. O teste emprega linhagens de *Salmonella typhimurium* com diferentes mutações no *operon* de histidina. Através de mecanismos distintos, estas mutações atuam

como pontos de acesso para agentes mutagênicos que causam danos ao DNA (Maron & Ames, 1983).

Neste trabalho, foi utilizada a linhagem TA98, que mede erro no quadro de leitura do DNA, como diagnóstico inicial. Esta linhagem abrange uma variedade de compostos e mostra-se sensível nos estudos com amostras de ar (Ducatti & Vargas, 2003; Claxton *et al.*, 2004). Além desta, foi utilizada a linhagem TA100, que identifica erros do tipo substituição dos pares de bases (Maron & Ames, 1983) nas amostras relacionadas ao biomonitoramento. Empregando as linhagens YGs, foi investigada a presença de substâncias nitroderivadas: a linhagem YG1021 apresenta o plasmídeo pYG216 onde está inserido o gene da nitroredutase clássica, enquanto que a YG1024, possui o plasmídeo pYG219 que apresenta o gene da *O*-acetiltransferase. Estas linhagens, derivadas da TA98, com alta atividade enzimática, possuem maior sensibilidade para nitrocompostos, como mononitroarenos (pYG216) ou dinitroarenos e aminas aromáticas (pYG219), do que a parental (Watanabe *et al.*, 1989; Umbuzeiro & Vargas, 2003).

Adicionalmente, analisou-se a atividade de metabólitos em ensaios em presença de sistema de metabolização P450 de mamíferos *in vitro* – fração S9- homogenato de células de fígado de rato Sprague-Dawley (4%) pré-tratado com AROCLOR1254 (Moltox LTDA., EUA) nas linhagens TA98, TA100 e YG1024.

As amostras foram avaliadas nas concentrações de 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 µg/placa, em duplicatas. O controle negativo usado foi o DMSO (5,0 µL/placa, CASRN. 67-68-5) e os controles positivos (TA98-S9: 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO), 0,05 µg/placa, CASRN. 56-57-5; TA98+S9, TA100+S9 e YG1024+S9: 2-aminofluoreno (2AF), 1,0 µg/placa, CASRN. 153-78-6; TA100-S9: azida sódica (AZS), 0,5 µg/placa, CASRN. 26628-22-8; linhagens YG-S9: 2-nitrofluoreno (2NF), 0,15 µg/placa, CASRN. 607-57-8; Merck – Brasil), de acordo com a linhagem e tratamento utilizado.

2.3.1 Análise estatística

As curvas dose-resposta, obtidas nos ensaios, foram avaliadas por análise de regressão através do programa SALANAL (*Salmonella Assay Analysis*, version 1.0, Integrated Laboratory Systems of Research Triangle Institute, RTP, North Carolina, EUA), como descrito em Vargas *et al.* (1998). Foram selecionados os modelos lineares ou Bernstein para análise da porção linear da curva dose-resposta (Bernstein *et al.*, 1982). A amostra foi considerada mutagênica em presença de significância estatística na análise de regressão e na ANOVA ($p \leq 0.05$). Os resultados foram expressos em revertentes/ μg (número de revertentes obtido na análise de regressão do Programa SALANAL multiplicado pela massa do extrato orgânico) ou por m^3 de ar amostrado (revertentes/ m^3).

2.4 Biomonitoramento humano

O estudo populacional ocorreu no período de setembro a novembro de 2011, concomitante ao do material particulado atmosférico. A coleta foi realizada em 45 crianças, entre 05 e 11 anos de idade. Para apresentar o estudo, foi realizada reunião com o Prefeito do Município, representantes das secretarias municipais e com diretores das escolas do município. As crianças foram selecionadas a partir de escolas localizadas na região próxima ao local no qual estava instalado o amostrador de ar, tendo como premissa não relatarem problemas de saúde e não terem realizado exames radiológicos no período do biomonitoramento. Os responsáveis pelas crianças receberam informações acerca dos objetivos da pesquisa e cópia do termo de consentimento com descrição do estudo. Foi aplicado um questionário abordando informações gerais e outras questões relevantes, em

entrevistas com pais ou responsáveis, para auxiliar na compreensão dos resultados. Do total de crianças, 23 eram meninas e 22 meninos, com média de idade de $9,97 \pm 1,544$ anos.

Foi realizada por técnicos da área de saúde a coleta de cerca de 4,0 mL de sangue, de cada criança, através de punção intravenosa com agulhas e seringas descartáveis estéreis. Após a coleta, o sangue foi imediatamente adicionado a tubos estéreis contendo 1,75 mL de solução anticoagulante – ACD (0,016M de ácido cítrico; 0,068M de citrato de sódio; 0,081M de glicose, previamente autoclavados), que foram rotulados, enviados para o laboratório e mantidos a 4°C até o momento do processamento. Além deste procedimento, foi realizado esfregação de células da mucosa oral, com escova de polietileno, posteriormente transferidas para solução salina fisiológica (0,9%) e transportadas ao laboratório, sob refrigeração e ao abrigo de luz.

Este trabalho é parte de uma pesquisa mais ampla, já aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), cadastrado pelo nº 07-042.

2.4.1 Teste do micronúcleo

As células esfoliadas da mucosa oral, coletadas e acondicionadas em solução salina fisiológica (0,9%) foram centrifugadas e fixadas com metanol e ácido acético. Na coloração das células foram empregados os reativos de Schiff's e Fast Green. A lâmina preparada foi analisada em microscópio com objetiva de alta resolução (400-1000) para a contagem das células. Na definição de um micronúcleo foi utilizado o critério de Tolbert *et al.* (1992). Os tipos celulares analisados incluíram as células basais, células diferenciadas,

células diferenciadas com micronúcleo, células diferenciadas com brotos nucleares, células binucleadas, cromatina condensada, cariorréxe, picnose e cariólise. As frequências de células basais, diferenciadas, binucleadas, cromatina condensada, cariorréxe, picnose e cariólise foram determinadas pela análise de 1000 células por indivíduo, enquanto a de micronúcleos e de brotos nucleares, por 2000 células por indivíduo (Thomas *et al.*, 2009).

2.4.2 Ensaio cometa

Utilizando os linfócitos isolados a partir da amostra de sangue realizou-se o ensaio cometa na versão alcalina, permitindo que danos no DNA, provenientes de vários processos biológicos, como quebras de cadeia simples, dupla ou lesões em sítios alcalilábeis ou ainda reparo incompleto dos sítios de excisão, fossem evidenciados (Speit & Hartmann, 1999). Os linfócitos foram obtidos por centrifugação sobre um gradiente de densidade de Ficol, sendo parte dessa fração corada e analisada em microscópio com o objetivo de verificar a viabilidade celular. Posteriormente, os linfócitos, misturados com agarose de baixo ponto de fusão, foram aplicados em lâmina previamente gelantizada com agarose, de ponto de fusão normal, cobertos por lamínula e mantidos em geladeira por 10 minutos. Depois de retirada a lamínula, a lâmina foi colocada em solução de lise por no mínimo uma hora, estando pronta para eletroforese em cuba horizontal. Durante esse processo, os fragmentos de DNA se movem mais rápido do que moléculas intactas, resultando na formação de “um cometa com cauda”. O comprimento da cauda obtida indica a quantidade de quebras das fitas de DNA presentes em determinada célula, segundo Banu *et al.* (2001). Após a eletroforese, as lâminas retiradas da cuba foram lavadas com solução de neutralização e fixadas em metanol absoluto. Após secas, foram estocadas sob

refrigeração até o momento da análise. Nessa fase, as lâminas foram coradas com brometo de etídio e analisadas em microscópio de fluorescência através de programa computacional específico *Comet Assay 2.2, Perceptive Instruments* (Suffolk, UK).

2.4.3 Análise dos Dados

Para a análise dos resultados obtidos no teste do MN foram utilizados modelos lineares generalizados com distribuição de Poisson para micronúcleos e para os brotos nucleares, ou modelos lineares generalizados com distribuição binomial negativa para os demais parâmetros de alteração nuclear (células basais, diferenciadas, picnose, cromatina condensada, cariorréxe e cariólise). O nível de significância adotada foi 5%. As análises foram realizadas usando o pacote SPSS para Windows, versão 18 e o pacote estatístico SAS (Proc Mixed-Statistical Analysis System) versão 9.1.

A análise dos dados do ensaio cometa foi realizada utilizando os parâmetros intensidade da cauda (% DNA na cauda do cometa), comprimento da cauda (distância medida do meio da cabeça do cometa até o último ponto visível da cauda) e momento da cauda (produto da quantidade de DNA na cauda e a distância média de migração de DNA na cauda). Foram comparados os dados segundo o sexo, ou seja, grupos de meninos e meninas, através da análise de variância com modelos hierárquicos. Nessa análise, os fatores foram organizados em níveis dentro de uma ordem específica (células consideradas dentro do sujeito e este dentro do grupo), permitindo a avaliação de toda variação dos danos.

Foram realizadas, ainda, correlação entre os parâmetros do teste do MN, incluindo os diferentes tipos celulares, tendo como variável dependente os três parâmetros do ensaio

cometa (intensidade, comprimento e momento da cauda), e análise de correlação entre os parâmetros do ensaio cometa (intensidade, comprimento e momento da cauda) e idade.

Para análise dos fatores de confusão, foi realizado teste T para os tipos celulares cromatina condensada, picnose, cariorréxe e cariólise (por apresentarem uma distribuição normal) e modelos lineares generalizados com distribuição de Poisson para analisar micronúcleos, brotos nucleares e as células binucleadas no ensaio Micronúcleo. Enquanto que para o ensaio cometa foi realizada análise de variância utilizando modelos hierárquicos para os parâmetros intensidade, comprimento e momento da cauda.

3. Resultados

3.1 Avaliação da atividade mutagênica do material particulado inalável

3.1.1 Concentrações de Material Particulado Inalável fino (MP2,5)

A concentração de MP2,5, durante o período de amostragem, apresentou 9% dos valores acima da média diária recomendada pela OMS, que é de $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (WHO, 2006): sendo dois episódios no inverno ($25,89 \mu\text{g}/\text{m}^3$; $31,74 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e na primavera ($39,41 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e $64,71 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e um no verão ($28,44 \mu\text{g}/\text{m}^3$). A variação na concentração foi de $2,03 \mu\text{g}/\text{m}^3$ a $64,71 \mu\text{g}/\text{m}^3$, sendo que ambos os valores foram observados na primavera (Figura 2). Os valores de massa orgânica extraída de cada *pool* (MOE) variaram de $0,68 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (*pool* 7) a $2,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (*pool* 4). Para os demais *pools*, em ordem crescente, os valores foram de $0,84 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (*pool* 8); $0,99 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (*pool* 9); $1,22 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (*pool* 6); $1,23 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (*pool* 5); $1,31 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (*pool* 2), $1,49 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (*pool* 1) e $1,83 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (*pool* 3).

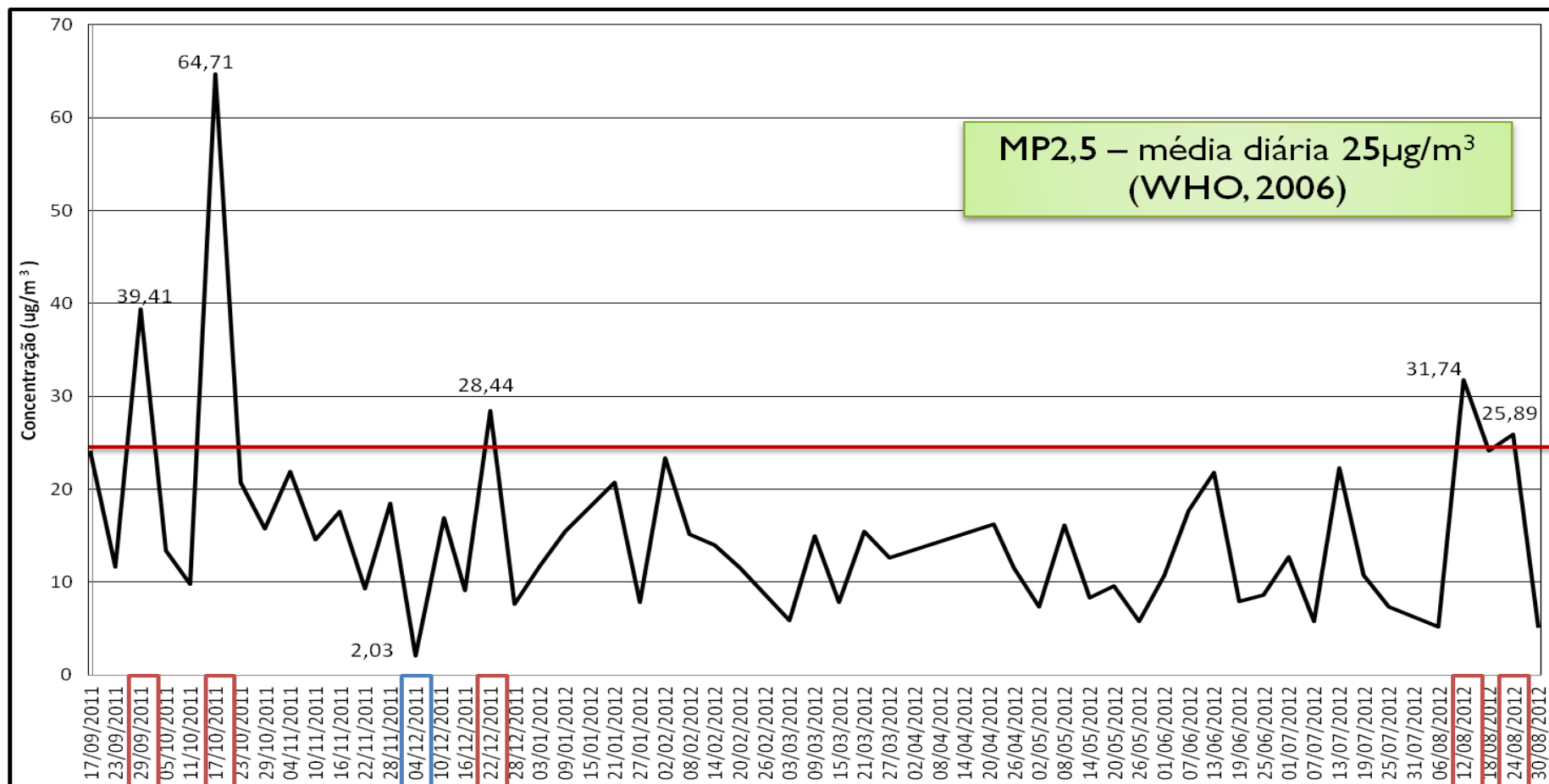


Figura 2. Concentração de MP2,5 no período amostrado. A Organização Mundial da Saúde recomenda média diária de 25 µg/m³. A variação na concentração foi de 2,03 µg/m³ a 64,71 µg/m³. Períodos de estudo: primavera (de 17 de setembro a 16 de dezembro de 2011), verão (de 22 de dezembro de 2011 a 15 de março de 2012), outono (21 de março a 19 de junho de 2012) e inverno (de 25 de junho a 30 de agosto de 2012). Em destaque, os valores acima do recomendado pela OMS e o menor valor encontrado na área de estudo.

3.1.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

A tabela 3 mostra as concentrações dos 16 HPAs considerados prioritários pela agência ambiental dos Estados Unidos (USEPA) e sua distribuição nos diferentes períodos analisados. Entre os *pools* de amostras estudados, o outono apresentou a maior concentração (5,65 ng/m³) de HPAs, seguido da primavera (3,08 ng/m³; somatório dos *pools* 1, 2a e 2b), do verão (2,80 ng/m³) e do inverno (1,74 ng/m³). Entre as diferentes espécies de HPAs, o benzo(g,h,i)perileno apresentou a maior concentração em todas as amostras na área de estudo, seguido do indeno(1,2,3-cd)pireno, cujos maiores valores foram obtidos na amostra de outono (1,73 ng/m³ e 1,17 ng/m³, respectivamente). Já acenaftaleno, naftaleno e fluoreno não foram detectados e apenas a amostra do período de verão apresentou acenafteno e fenantreno. Portanto, dos oito HPAs considerados potencialmente cancerígenos para a espécie humana, sete encontraram-se na área de estudo (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluorantreno, benzo(k)fluorantreno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno e dibenzo(a,h)antraceno), sendo que naftaleno esteve ausente; entre as demais oito espécies estudadas, seis (acenafteno, antraceno, benzo(g,h,i)perileno, fenantreno, fluorantreno e pireno) estiveram presentes na área e duas (acenaftaleno e fluoreno) ausentes (IARC, 2010). A figura 3 mostra a concentração de HPAs considerados potencialmente carcinogênicos, variando entre 0,44 ng/m³ e 3,64 ng/m³ e as outras espécies, com variação entre 0,22 ng/m³ e 2,01 ng/m³, nos diferentes períodos amostrados.

Tabela 3. Quantificação de HPAs na área de estudo obtida entre setembro de 2011 e agosto de 2012. As concentrações estão expressas em ng/m³.

HPAs	Grupo	P1	P2a	P2b	V	O	I
Acenaftaleno	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acenafteno	3	ND	ND	ND	0,02	ND	ND
Antraceno	3	ND	ND	ND	0,01	0,03	0,01
Benzo(a)antraceno	2B	0,02	0,01	ND	0,04	0,14	0,05
Benzo(a)pireno	1	0,14	0,06	0,12	0,21	0,51	0,17
Benzo(b)fluoranteno	2B	0,17	0,07	0,15	0,23	0,49	0,16
Benzo(g,h,i)perileno	3	0,33	0,2	0,31	1,01	1,73	0,47
Benzo(k)fluoranteno	2B	0,11	0,06	0,09	0,17	0,38	0,15
Criseno	2B	0,14	0,07	0,09	0,18	0,49	0,22
Dibenzo(a,h)antraceno	2A	0,18	0,05	0,08	0,24	0,46	0,08
Fenantreno	3	ND	ND	ND	0,01	ND	ND
Fluoranteno	3	0,05	0,01	ND	0,05	0,14	0,05
Fluoreno	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Indeno(1,2,3-cd)pireno	2B	0,21	0,12	0,19	0,59	1,17	0,33
Naftaleno	2B	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pireno	3	0,04	0,01	ND	0,04	0,11	0,05
Total		1,39	0,66	1,03	2,80	5,65	1,74

Resultados obtidos a partir da análise por Cromatografia Acoplada a Espectrofotômetro de Massa. ND, menor que o limite de detecção.

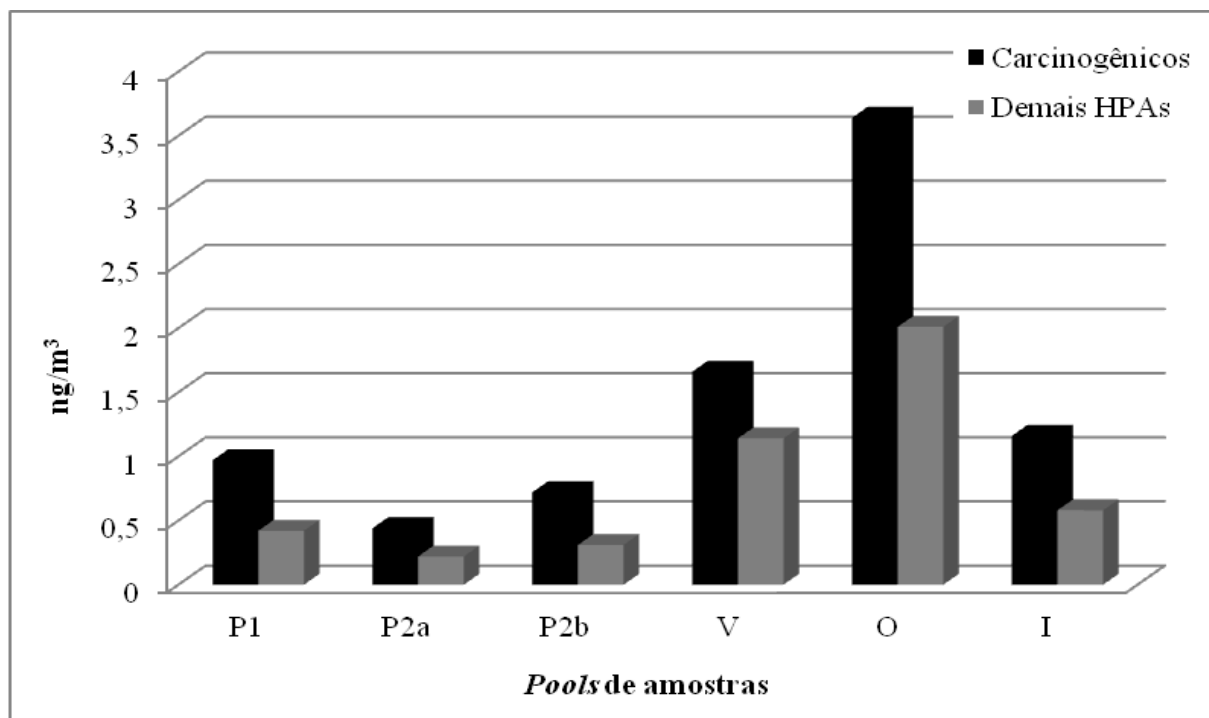


Figura 3. Concentração de HPAs nos extratos orgânicos do material particulado MP2,5 em Santo Antônio da Patrulha, RS em diferentes períodos de estudo. HPAs carcinogênicos dos grupos 1, 2A ou 2B (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluorantreno, benzo(k)fluorantreno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno e dibenzo(a,h)antraceno); demais HPAs: acenafteno, antraceno, benzo(g,h,i)perileno, fenantreno, fluorantreno e pireno (IARC, 2010).

3.2 Ensaio *Salmonella*/microsoma

A análise dos extratos orgânicos preparados a partir de 09 *pools* de material particulado MP2,5 permitiu identificar atividade mutagênica com valores (revertentes/m³) de negativos na primavera a $8,3 \pm 0,69$ no outono (-S9) para a linhagem TA98 em ensaios diretos e de negativos na primavera a $5,4 \pm 0,36$ no inverno (+S9) para metabólitos (Figura 4). O diagnóstico dos *pools* referentes às estações verão, outono e inverno, foi realizado com a linhagem TA98 em presença e ausência de S9 mix. Foram realizadas, também,

análises com a linhagem TA100, abrangendo o período da primavera quando realizado o biomonitoramento com crianças. Na figura 5 é possível observar a variação nos resultados (revertentes/m³), de negativos a $14,8 \pm 4,23$ e $17,5 \pm 2,72$ na ausência e na presença de fração S9, respectivamente.

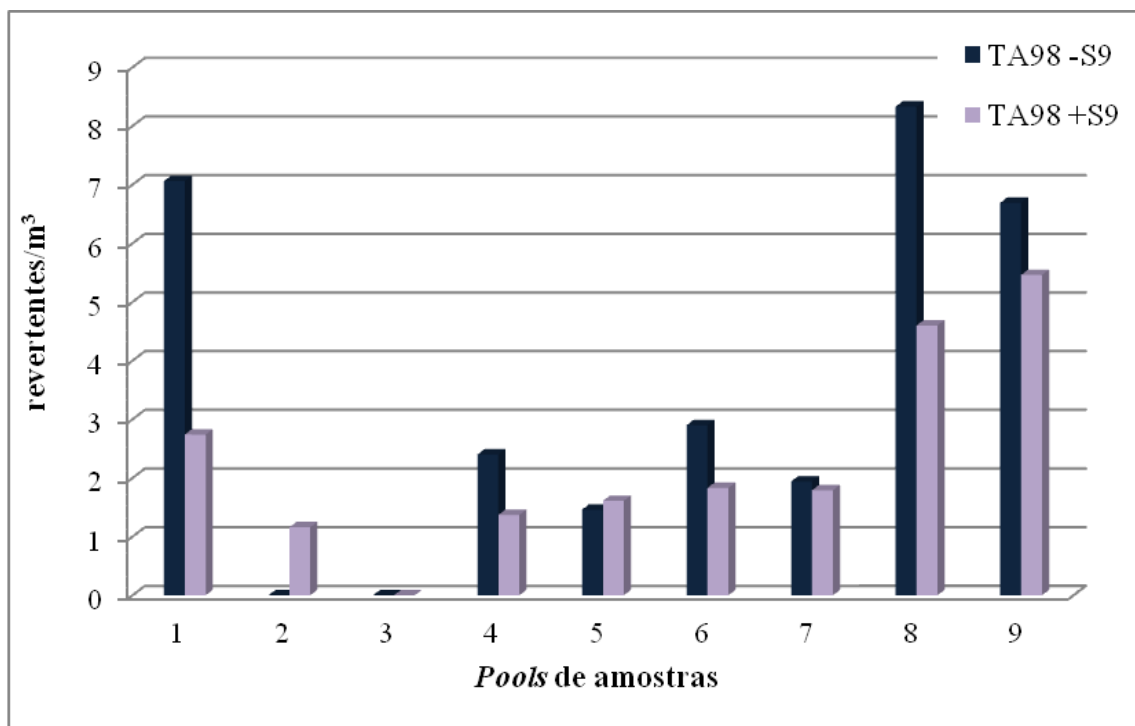


Figura 4. Atividade mutagênica dos extratos orgânicos atmosféricos (MP2,5) avaliados pelo ensaio de microssuspensão em *Salmonella*/microsoma com a linhagem TA98 em presença e ausência de metabolização (S9), nos nove *pools* de amostras (1–6, primavera; 7, verão; 8, outono; 9, inverno) do município de Santo Antônio da Patrulha, RS. Controle negativo (DMSO): $43,7 \pm 15,19$ revertentes/ placa (TA98-S9) e $32,8 \pm 12,37$ revertentes/placa (TA98+S9); controles positivos (4NQO): $268 \pm 107,4$ revertentes/placa (TA98-S9) e (2AF): $361,1 \pm 158,91$ revertentes/placa (TA98+S9).

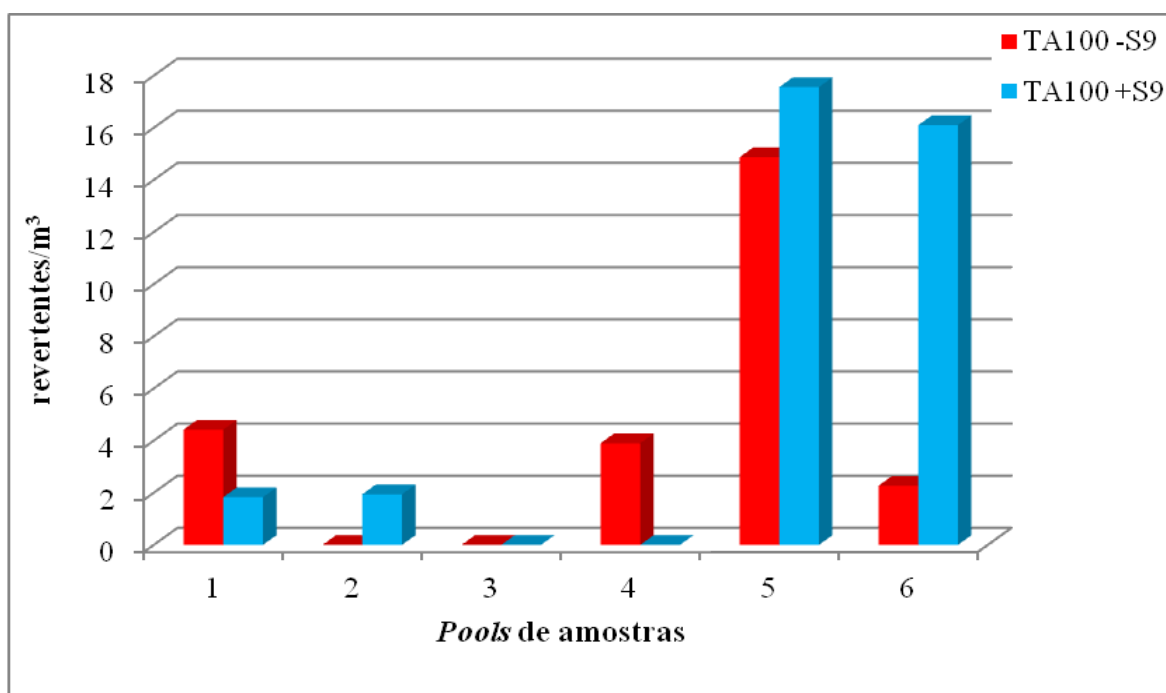


Figura 5. Atividade mutagênica dos extratos orgânicos atmosféricos (MP2,5) avaliados pelo ensaio de microssuspensão em *Salmonella*/microssoma, com a linhagem TA100 em presença e ausência de metabolização (S9), nos *pools* de amostras de Santo Antônio da Patrulha, RS, no período da primavera. Controle negativo (DMSO): $231,5 \pm 79,19$ revertentes/placa (TA100-S9) e $199,8 \pm 56,73$ revertentes/placa (TA100+S9); controle positivo (AZS): $917,2 \pm 366,27$ revertentes/placa (TA100-S9) e (2AF): $374,8 \pm 90,6$ revertentes/placa (TA100+S9).

Os resultados positivos observados com as linhagens YG, mostraram a presença de compostos nitrogenados com prevalência de mononitroarenos (Tabela 4), apresentando um valor discrepante no *pool* 1 ($38,9 \pm 2,45$), seguido dos *pools* 7, 8 e 9, cujos valores são, respectivamente, $12,6 \pm 0,87$; $18,8 \pm 1,60$ e $12,1 \pm 0,83$ revertentes/ μg , no ensaio com a linhagem YG1021. No *pool* 4 o maior valor em revertentes/ μg foi apresentado na linhagem YG1024-S9 ($5,2 \pm 0,53$), indicando presença de dinitroarenos. A partir do ensaio com a

linhagem YG1024+S9, observou-se a prevalência de aminas aromáticas nos *pools* 2 ($1,6 \pm 0,21$ revertentes/ μg), 5 ($6,9 \pm 0,79$ revertentes/ μg) e 6 ($16,9 \pm 1,57$ revertentes/ μg).

Tabela 4. Atividade mutagênica dos extratos orgânicos atmosféricos (MP2,5) avaliados pelo ensaio de microssuspensão em *Salmonella*/microssoma, dos nove *pools* obtidos no município de Santo Antônio da Patrulha, RS, em revertentes/ μg .

Pool de amostras	Ausência de S9			Presença de S9	
	TA98	YG1021	YG1024	TA98	YG1024
1	$4,7 \pm 0,58$	$38,9 \pm 2,45$	$17,2 \pm 1,01$	$1,8 \pm 0,31$	$10,5 \pm 0,86$
2	NEG	NT	NT	$0,9 \pm 0,14$	$1,6 \pm 0,21$
3	NEG	NT	NT	NEG	NT
4	$0,9 \pm 0,2$	NEG	$5,2 \pm 0,53$	$0,5 \pm 0,29$	$0,6 \pm 0,27$
5	$1,2 \pm 0,25$	$4,1 \pm 0,48$	$6,8 \pm 0,86$	$1,3 \pm 0,18$	$6,9 \pm 0,79$
6	$2,4 \pm 1,28$	NEG	$2,5 \pm 0,37$	$1,5 \pm 0,23$	$16,9 \pm 1,57$
7	$2,9 \pm 0,19$	$12,6 \pm 0,87$	$7,8 \pm 1,11$	$2,6 \pm 0,27$	$6,5 \pm 0,76$
8	$9,9 \pm 0,84$	$18,8 \pm 1,60$	$7,7 \pm 1,41$	$5,5 \pm 0,46$	$2,8 \pm 0,8$
9	$6,8 \pm 0,47$	$12,1 \pm 0,83$	$9,5 \pm 0,93$	$5,5 \pm 0,37$	$2,1 \pm 0,46$

Pools 1–6, primavera; 7, verão; 8, outono e 9, inverno. NEG – resultado negativo; NT – Não testado. Controle negativo (DMSO): $43,7 \pm 15,19$ revertentes/placa (TA98-S9), $32,8 \pm 12,37$ revertentes/placa (TA98+S9), $66,2 \pm 46,71$ revertentes/placa (YG1024-S9), $118,8 \pm 59,74$ revertentes/placa (YG1024+S9) e $97,2 \pm 53,81$ revertentes/placa (YG1021); controles positivos (4NQO): $268 \pm 107,4$ revertentes/placa (TA98-S9), (2NF): $2819,5 \pm 1158,01$ revertentes/placa (YG1024-S9), $3789,7 \pm 1108,91$ revertentes/placa (YG1021) e (2AF): $361,1 \pm 158,91$ revertentes/placa (TA98+S9), $1235,8 \pm 175,43$ revertentes/placa (YG1024+S9).

3.3 Biomonitoramento humano

3.3.1 Ensaios do Micronúcleo e Cometa

Em relação ao ensaio do micronúcleo (MN) a média de MN encontrada na população de crianças avaliadas foi de $0,27 \pm 0,407$ (‰). Para os demais tipos celulares avaliados, os valores médios variaram de $0,56 \pm 0,727$ para brotos nucleares a $57,55 \pm 24,920$ para cariorréxe (Tabela 5). A população investigada foi subdividida em dois grupos de acordo com o sexo. Entre as crianças do sexo masculino, a média de MN foi de $0,22 \pm 0,378$ (‰) e entre as do sexo feminino de $0,31 \pm 0,438$ (‰). No entanto, a diferença encontrada quanto a sexo para MN ou qualquer dos demais tipos celulares investigados não foi significativa (brotos nucleares, células binucleadas, cromatina condensada, picnose, cariorréxe e cariólise) (Tabela 5).

Em relação ao ensaio cometa, a média encontrada na população estudada foi de $23,07 \pm 12,442$ (comprimento da cauda), $7,28 \pm 11,657$ (intensidade da cauda) e $0,95 \pm 2,302$ (momento da cauda). Embora o grupo de crianças do sexo masculino tenha obtido as maiores médias nos três parâmetros analisados as diferenças não apresentaram significância estatística em relação aos indivíduos do sexo feminino (Tabela 5). Da mesma forma, a análise de correlação entre os parâmetros do cometa (intensidade, comprimento e momento da cauda) e idade, não apresentou correlação significativa.

Foi ainda investigada a correlação entre os três parâmetros do ensaio cometa (intensidade, comprimento e momento da cauda) e do teste do micronúcleo, (micronúcleos, brotos nucleares, células basais, diferenciadas, picnose, cromatina condensada, cariorréxe e cariólise), mas a ausência de significância mostrou que estes são independentes.

Tabela 5. Descrição (média e desvio padrão) dos parâmetros investigados pelo ensaio cometa e teste do micronúcleo em mucosa bucal (%), para a população de crianças investigadas em Santo Antônio da Patrulha, RS, e para os grupos de acordo com o sexo.

		Geral	Meninos	Meninas
Parâmetros do ensaio cometa	Comprimento da cauda	23,07±12,442	23,19 ± 3,587	22,94 ± 3,452
	Intensidade da cauda	7,28±11,657	7,71 ± 3,311	6,95 ± 2,665
	Momento da cauda	0,95±2,302	1,0 ± 0,534	0,91 ± 0,472
Parâmetros do teste do micronúcleo em mucosa oral	Binucleada	0,51±0,694	0,52 ± 0,749	0,50 ± 0,659
	Picnose	6,97±5,746	6,47 ± 6,03	7,42 ± 5,578
	Cromatina condensada	46,37±16,330	47,86 ± 15,644	45,08 ± 17,136
	Cariorréxe	57,55±24,920	54,05 ± 25,682	60,62 ± 24,361
	Cariólise	6,60±5,540	7,09 ± 5,735	6,17 ± 5,451
	Micronúcleo	0,27±0,407	0,22 ± 0,378	0,31 ± 0,438
	Broto nuclear	0,56±0,727	0,53 ± 0,733	0,61 ± 0,737

3.3.2 Fatores de confusão da amostra: fumo passivo e doenças respiratórias

A partir da análise das entrevistas realizadas com pais ou responsáveis foi possível detectar que, das 45 crianças investigadas, 20 tinham contato com pessoas fumantes na residência. Foram registrados, ainda, no histórico levantado, os relatos de doenças respiratórias pregressas, sendo que 12 crianças apresentaram asma ou bronquite, 28 rinite (das quais 12 não manifestaram mais crises) e nove não relataram doenças respiratórias. É importante registrar que estas informações foram relatadas por pais ou responsáveis e não provenientes de diagnóstico médico.

3.3.3 Análise dos Fatores de Confusão

Em relação ao teste do micronúcleo e a análise dos diferentes tipos celulares, foi observada diferença significativa para indução de MN e fumo passivo ($p = 0,021$), ou seja, crianças que convivem com fumantes têm um risco aumentado de apresentarem maior valor de MN, através da análise de modelos lineares generalizados com distribuição de Poisson.

Os demais fatores analisados não apresentaram significância para nenhuma das variáveis analisadas nos biomarcadores de genotoxicidade aplicados.

4. Discussão

A poluição do ar urbano é uma combinação de poluentes que são substancialmente transformados através de reações atmosféricas, formando poluentes secundários (Claxton *et al.*, 2004; IARC, 2013). A população humana está exposta a poluentes gerados no interior de suas casas, nas escolas ou no ambiente de trabalho, ao ar livre e em outros microambientes, como por exemplo, no trânsito. A poluição gerada nestes diversos ambientes é produzida a partir de uma mistura de fontes que, por conseguinte, terão uma composição variada e diferentes efeitos (Long *et al.*, 2001). Em revisão da literatura, Claxton *et al.* (2004) ressaltaram a presença e distribuição de agentes mutagênicos adsorvidos ao material particulado do ar em diferentes continentes, discutindo suas origens, principais grupos, métodos de análise e efeitos. É importante ressaltar que substâncias cancerígenas no ar contribuem para a carga global de câncer, especialmente de

pulmão, que recebe as doses inaladas de muitos contaminantes do ar, mesmo quando presentes em concentrações baixas e aparentemente triviais (IARC, 2013).

Considerando a exposição da população humana, as crianças representam um grupo particularmente mais sensível do que adultos aos poluentes do ar (Huen *et al.*, 2006; Neri *et al.*, 2006a; Ashmore & Dimitroulopoulou, 2009; Holland *et al.*, 2011; Gajski, *et al.*, 2013) e a outros agentes tóxicos, incluindo cancerígenos, presentes nos alimentos, na água e no solo (Neri *et al.*, 2006a; Coronas, 2012). Com padrão de exposição diverso dos adultos, diferenças fisiológicas e comportamentais, esta sensibilidade se deve, principalmente, a diferenças metabólicas para detoxificação e a excreção das toxinas, ao grande volume de ar inalado, as maiores doses diárias de alimentos e de água (por peso corporal) comparado aos adultos, além do contato com o solo e com a poeira doméstica (Suk *et al.*, 2003; Neri *et al.*, 2006a; Salvi, 2007). As crianças passam por um rápido e delicado período de crescimento e de desenvolvimento dos seus sistemas, possuem capacidade mais restrita de reparar danos provocados por agentes tóxicos do ambiente e podem ser suscetíveis a níveis muito baixos de exposição, em alguns casos, abaixo dos limites de detecção dos métodos atuais (Suk *et al.*, 2003; Neri *et al.*, 2006a). Estudos epidemiológicos têm mostrado relação entre a exposição a agentes genotóxicos durante o estágio de desenvolvimento das crianças e aumento do risco de câncer (Neri *et al.*, 2006a).

Um dos problemas relacionados ao biomonitoramento populacional é o efeito de fatores de confusão. No entanto, as crianças não fumam, não consomem álcool e não estão expostas a poluentes ocupacionais, sendo, por este motivo, a interferência nos resultados reduzida ao mínimo (Gajski *et al.*, 2013), embora estejam expostas, por exemplo, ao fumo passivo. Em geral, na maior parte do tempo as crianças permanecem na região onde residem. Logo, a sua exposição está intimamente relacionada com as concentrações dos poluentes no interior das suas casas, na escola, no transporte e nas atividades de lazer

externo. Muitos estudos têm mostrado que quando as crianças vivem em áreas com níveis elevados de poluição estão sujeitas a relevantes riscos à saúde, comparadas àquelas que residem em locais com menores níveis de poluição do ar (Huen *et al.*, 2006; Salvi, 2007; Sánchez-Guerra *et al.* 2012; Sisenando *et al.*, 2012).

Considerando estes aspectos, no presente estudo foi associado: *i*) como marcadores ambientais, a coleta de MP_{2,5} em área considerada de referência para poluição atmosférica em relação ao PTS em estudos anteriores, análise do potencial mutagênico de extratos orgânicos de MP_{2,5} e determinação da concentração dos 16 HPAs considerados prioritários pela USEPA; *ii*) como marcadores de exposição e/ou efeito populacional, o biomonitoramento genético de crianças, utilizando o teste de MN em células de mucosa bucal e ensaio do Cometa em linfócitos de sangue periférico.

Estudos anteriores indicaram que o local de estudo, município de Santo Antônio da Patrulha, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, pode ser considerado como uma área de referência, uma vez que apresentou valores negativos e/ou basais para atividade mutagênica em PTS, bem como para a concentração de HPAs comparado com outras áreas urbanas e industriais (Vargas, 2003; Pereira, 2008; Coronas *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2011; Brito *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013).

4.1 Poluição atmosférica: concentrações de HPAs e presença de mutagênese no material particulado MP_{2,5}

A região do município de Santo Antônio da Patrulha caracteriza-se por estar fora dos corredores de dispersão de ventos das principais áreas industriais do estado, apresentar economia voltada a pequenas propriedades agrícolas, destacar-se como produtora de

aguardente de cana de açúcar e apresentar trânsito de veículos locais. O percentual de veículos na região apresentou uma elevação de aproximadamente 82% entre 2005, período em que foi realizado o primeiro trabalho nesta região, e 2012. Em 2005, 29% da população estava motorizada, já em 2012, este número passou para 49% (IBGE, 2012). Este aumento da frota de veículos automotores circulantes pode explicar as diferenças observadas entre os dois períodos de estudo da área. Assim, comparando os estudos realizados por Coronas *et al.* (2009) e Pereira *et al.* (2010; 2013) analisando material particulado total (PTS) do período de agosto de 2004 a novembro de 2005, todas as amostras se encontravam dentro dos parâmetros legais estabelecidos pela legislação brasileira (Brasil, 1990) e pela recomendação da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2000). No entanto, a média diária de MP_{2,5} observada durante o presente estudo, ultrapassou o limite definido pela OMS (25 µg/m³) em cinco episódios (9%), dos quais os menores e maiores valores foram observados no período da primavera (2,03 a 64,71 µg/m³) (Figura 2) e que apresentou, ainda, um dos maiores valores totais (3,08 ng/m³) de HPAs (Tabela 3). Brito *et al.* (2013), mostraram, em estudo realizado em período similar ao avaliado neste estudo, no município de Porto Alegre, capital do estado, RS, Brasil, em local influenciado por trânsito de veículos, uma variação na concentração de MP_{2,5} de 4 a 79 µg/m³ e 40% de eventos acima do valor definido pela OMS. As evidências observadas neste estudo ratificam a necessidade de revisão de limites seguros para efeitos à saúde humana como já alertado em diversas publicações científicas (Vargas, 2003; Claxton *et al.*, 2004; Vargas *et al.*, 2011; Lemos *et al.*, 2012).

Comparando especificamente a concentração dos HPAs analisados no primeiro estudo com os mesmos do segundo período (benzo(g,h,i)perileno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(a)pireno) a variação observada foi de 0,19 ng/m³ (novembro) a 0,67 ng/m³

(janeiro) e as concentrações observadas no presente estudo, foram de 0,56 ng/m³ (primavera) a 4,88 ng/m³ (outono). Fica evidente um aumento no valor total destes HPAs, que pode estar associado à elevação da frota de veículos no município. Contudo, os valores são menores do que os encontrados no município de Montenegro, RS, Brasil, para estes mesmos compostos, no mesmo período do primeiro estudo (variação de 2,87 ng/m³, abril, a 16,04 ng/m³, agosto). Esse município está localizado em área sob influência de diferentes tipos de fontes antropogênicas, incluindo poluentes petroquímicos (Pereira, 2008; Pereira *et al.*, 2010; 2013).

Em trabalho realizado por Vargas *et al.*, (2011) no município de Esteio, RS, Brasil, área sob a influência de refinaria de petróleo, o valor mais elevado de HPAs foi de 7,19 ng/m³ observado na primavera. Já em estudo realizado por Coronas (2012), no município de Triunfo, também no RS, em a área de exposição a passivos de preservativos de madeira, o valor mais elevado foi de 12,94 ng/m³ em janeiro de 2010. Desta forma, comparativamente com outras áreas do estado, os teores observados no presente estudo foram inferiores.

Entre os HPAs analisados no presente estudo, o benzo(g,h,i)perileno (marcador de emissões veiculares), indeno(1,2,3,cd)pireno, proveniente de emissões de queima de madeira, apresentaram níveis mais elevados do que os demais HPAs (Vasconcelos *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2010). Em concentrações mais reduzidas foram observadas espécies de benzo(b)fluoranteno e de benzo(k)fluoranteno (encontrados em regiões de plantio de cana-de-açúcar, cuja queima torna-se necessária para a retirada da planta); benzo(a)antraceno (indicativo de emissões veiculares a gasolina e diesel) (Yanker *et al.*, 2002; Rehwagen *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2010) e benzo(a)pireno (proveniente de queima de matéria orgânica, da queima de carvão e presente na fumaça de cigarro), este último classificado como cancerígeno humano (IARC,2012; Sram *et al.*, 2013). Na avaliação atual, durante o

outono observou-se o maior valor, tanto no total de HPAs como no teor de cada espécie, enquanto no período de inverno foram observadas as menores concentrações.

Ainda, em relação às espécies de HPAs mais presentes na área de estudo, benzo(g,h,i)perileno e indeno(1,2,3-cd)pireno, é importante referir que também apresentaram teores mais elevados em outros estudos no Rio Grande do Sul, incluindo a primeira fase de estudos em Santo Antônio da Patrulha (PTS), além dos municípios de Montenegro e Esteio (Vargas *et al.*, 2011) ambos os locais sob influência de indústrias petroquímicas e intenso tráfego de veículos. Desta forma, o local do presente estudo apresentou características similares às demais áreas regionais, apenas atenuadas pelas características próprias do município.

Em relação à mutagenicidade do material particulado na área de estudo as respostas variaram de negativas na primavera a $8,3 \pm 0,69$ no outono para ensaios diretos (-S9) e de negativos a $5,4 \pm 0,36$ no inverno em presença de metabolização (+S9) para danos de erro no quadro de leitura (TA98). As respostas mais elevadas observadas no inverno, período de menores concentrações de HPAs, cujo efeito é dependente de metabolização, deveu-se, provavelmente, a condições climáticas dessa estação, as quais concentram os poluentes no ar, apresentando menor dispersão. Concomitante ao período de biomonitoramento humano, na primavera, foi realizada análises com a linhagem TA100, sendo possível observar uma variação dos resultados (revertentes/m³) de negativos a $14,8 \pm 4,23$ e $17,5 \pm 2,72$, na ausência e na presença de fração S9, respectivamente. A continuidade de caracterização dos demais períodos do ano para a presença de mutagenicidade em MP2,5 foi realizada apenas para danos por erro no quadro de leitura, uma vez que o diagnóstico em TA100 não acrescentou informações relevantes ao estudo, confirmando dados da literatura de que a grande maioria dos poluentes atmosféricos causam os dois tipos de danos moleculares. Estudos anteriores confirmam estas evidências regionalmente (Vargas, 2003; Vargas *et al.*, 2011).

As respostas de mutagênese observadas na área de estudo são relativamente baixas quando comparadas com as relatadas para a capital do estado, Porto Alegre, em período semelhante (Brito *et al.*, 2013) com variação de menores valores no verão ($3,4 \pm 0,48$, -S9; $4,3 \pm 0,51$, +S9) e maiores no inverno ($53,4 \pm 4,47$, -S9; $31,5 \pm 5,61$, +S9). É importante destacar, ainda, que os resultados observados no *pool* 3 (um dos investigados na primavera) mostraram-se negativos, apesar de conter o filtro com a maior concentração de material particulado (Figura 2) e massa orgânica extraída de $1,83 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Este *pool* foi obtido em período no qual ocorreu atividade do vulcão Puyehue, no Chile, cuja ação dos ventos provocou a dispersão das cinzas sobre o sul do Brasil (Lima *et al.*, 2012). Esse *pool* apresentou uma das menores concentrações e tipos de HPAs, em comparação a outros *pools* analisados.

A presença de nitro-HPAs e aminas aromáticas, como definido no diagnóstico com as linhagens YGs nas amostras estudadas, contribuíram substancialmente para a caracterização da mutagenicidade das amostras. A classificação como mononitrocompostos observada, é característica de áreas urbanas, como já evidenciado em outros estudos realizados no estado (Vargas, 2003; Vargas *et al.*, 2011).

4.2 Biomonitoramento genético em população de crianças

Em relação ao estudo de biomonitoramento da população de crianças, os resultados obtidos envolvendo os parâmetros do ensaio cometa e os tipos celulares analisados no teste do micronúcleo não mostraram correlação significativa, evidenciando que se constituíram em eventos independentes. No entanto, suas respostas apresentaram um direcionamento similar.

Focalizando o teste do micronúcleo, a população de crianças apresentou uma média de $0,27 \pm 0,407$ (‰) MN, similar à observada para região de referência em estudo realizado na região amazônica do Brasil ($0,29 \pm 0,41$ ‰) (Sisenando *et al.*, 2012) e superior à observada no Rio Grande do Sul em área de referência para população investigada na região do município de Triunfo (0,14 ‰) por Coronas, 2012. Estes valores para área de referência estão, ainda, dentro do intervalo considerado adequado nas frequências de micronúcleos em áreas de referência para a população em geral (0,32–1,70 ‰), como descrito por Bonassi *et al.* (2011). Cabe ressaltar que os valores observados em estudo anterior realizado no município de Santo Antônio da Patrulha (período de 2004-2005) em população de homens adultos, foram inferiores (0,06‰) (Pereira *et al.*, 2013). Quanto aos demais tipos celulares analisados a partir do teste MN, o presente estudo apresentou médias (‰) em geral mais baixas do que as observadas por Bonassi *et al.* (2011) para áreas de referência em relação à população em geral. Assim, relatou para brotos nucleares valores médios de 1,36 (presente estudo: 0,56), células binucleadas 3,04 (presente estudo: 0,51) e menos elevadas para picnose 4,38 (presente estudo: 6,97) e cariorréxe 2,23 (presente estudo 57,55). Em estudo envolvendo crianças no município de Triunfo, RS, em área de referência, também foram observados valores menores para picnose (1,8) e cariorréxe (14,6).

Para o ensaio cometa, Collins *et al.* (2008) recomendam a utilização do parâmetro intensidade da cauda (% de DNA), uma vez que este cobre a mais ampla gama de danos e está linearmente relacionado à frequência de quebras. No entanto, no presente estudo foram considerados os valores observados nos três parâmetros, comprimento, momento e intensidade da cauda, devido ao estudo focalizar a busca de dados populacionais basais. As médias encontradas no total de crianças analisadas na área de estudo foram de $7,28 \pm 11,657$, para intensidade da cauda; $23,07 \pm 12,442$, para comprimento da cauda e

0,95±2,302, para momento da cauda. Os valores de intensidade da cauda estão em ordem de grandeza similar aos observados em Triunfo, RS. Neri *et al.* (2006b) relatam que em estudo realizado no México, os valores de área de referência foram mais elevados tanto para comprimento (41,7±3,40), como para momento (3,2±0,34) da cauda. Considerando os valores observados no município de Santo Antônio da Patrulha (período de 2004-2005) em população de homens adultos, foram inferiores para intensidade (6,5±2,81) e momento da cauda (0,7±0,36) (Pereira *et al.*, 2013).

Frente a esses resultados comparativos foi possível verificar que alguns parâmetros estão mais elevados tanto em relação aos estudos anteriores realizados no Rio Grande do Sul com crianças e adultos como com dados internacionais.

Os biomarcadores foram analisados quanto à diferença sexual. Não houve diferenças significativas entre os tipos celulares analisados no teste do micronúcleo em relação ao sexo, assim como foi também evidenciado por Neri *et al.* (2003), apesar da média de células com indução de micronúcleos ter sido maior em meninas. Em relação à idade das crianças, não se observou diferença estatisticamente significativa. Bonassi *et al.* (2011) relataram elevação na média de MN em indivíduos do sexo masculino e com o aumento da idade (0–9 anos: 1,08±0,09; 10–19: 1,27±0,08).

A variável sexo não apresentou correlação em relação aos parâmetros intensidade, comprimento e tamanho da cauda avaliados no ensaio cometa. Vários autores também encontraram valores similares de danos primários no DNA entre indivíduos dos sexos masculino e feminino (Holz *et al.*, 1995; Frenzilli *et al.*, 1997), contudo, Gajski *et al.* (2013) estudando uma população de crianças saudáveis na Croácia obteve níveis mais elevados de danos em meninas para o parâmetro comprimento da cauda, sendo similares para intensidade e momento da cauda. Alguns autores sugerem uma acumulação de danos primários ao DNA idade-dependente, com aumento na frequência de mutação com a idade

e elevação nos níveis de danos ao DNA (Jones *et al.*, 1995; Diem *et al.*, 2002), ou, ainda, sugerindo que a capacidade de reparo diminui com a idade. No entanto, no presente estudo não foi possível observar correlação com a idade. Contudo, segundo Gajski *et al.* (2013), esse resultado pode estar relacionado a pequena variação na idade das crianças amostradas.

4.3 Análise dos fatores de confusão

Entre os fatores de confusão avaliados, foi possível verificar que apenas as crianças que convivem com fumantes têm um risco aumentado de apresentar maior indução de micronúcleo. Segundo Bonassi *et al.* (2011), pessoas expostas ao tabaco têm uma média de $6,17 \pm 0,49$ (‰) de MN, enquanto não expostas apresentam média de $3,09 \pm 0,18$ (‰). Holland *et al.* (2011) relataram que há um aumento de 30% na frequência de MN nas crianças que estão expostas a fumaça de cigarro. Ainda, a poluição do ar em diferentes regiões do mundo está associada a uma elevação de cerca de 30 a 130% para crianças expostas em comparação a grupos de referência.

4.4 Conclusões

Os dados apresentados neste estudo indicam a importância de realização de levantamentos regionais, nos quais os valores basais para área de referência sejam identificados e possam servir para comparações em estudos populacionais futuros, principalmente em populações de crianças. Este é um grupo mais suscetível a danos ao DNA, uma vez que estão frente a padrões diferentes de exposição, recebem doses diárias

maiores de agentes tóxicos, incluindo os cancerígenos, e podem apresentar diferenças quanto à detoxificação e aos processos de reparo.

Os tipos de poluentes, os níveis de exposição, os fatores socioeconômicos e culturais, os hábitos alimentares, o estilo de vida, a etnia e a suscetibilidade gênica podem contribuir na identificação de riscos específicos. A suscetibilidade a doenças pode estar relacionada à diversidade genética da população humana. Dessa forma, uma melhor compreensão das influências genéticas sobre a resposta ambiental poderia levar à identificação de fatores de riscos à saúde, fornecendo uma base para a prevenção de doenças e propiciando a elaboração de programas de intervenção precoce, principalmente em crianças.

Apesar dos resultados terem evidenciado presença de teores de HPAs e mutagênese em MP_{2,5}, o biomonitoramento de crianças indicou, tanto para o ensaio cometa quanto para micronúcleo em células bucais, valores geralmente dentro dos limites estabelecidos em várias partes do mundo para áreas de referência, embora alguns parâmetros tenham sido mais elevados. Esses dados remetem a questionamento quanto à definição de áreas de referência para biomonitoramento humano, incluindo a região investigada.

O material particulado liberado de diversas fontes de poluentes do ar (especialmente MP_{2,5}, que pode penetrar profundamente no trato respiratório, aumentando a ação genotóxica) pode ser transportado por milhares de quilômetros através da atmosfera, permanecendo por um longo período de tempo. Estes fatores dificultam o estabelecimento de áreas que possam ser caracterizadas como referência para poluição do ar. O número de estudos envolvendo avaliação de danos genéticos em crianças expostas à poluição do ar ainda é limitado, não só no Brasil, como no mundo todo.

A OMS, em recente publicação, recomendou a revisão dos limites estabelecidos em 2006 para material particulado e outros compostos, pois há evidências de que estes poluentes afetam a saúde da população humana.

A realização de estudos associando biomonitoramento genético e mutagenicidade do ar torna-se uma ferramenta importante, principalmente em áreas de referência, para que sejam estabelecidos valores basais que poderão ser utilizados na comparação com estudos realizados em áreas sob influência de atividades antrópicas. Apesar de atualmente a poluição do ar ter sido classificada como cancerígena (Grupo 1), ainda não há novos limites estabelecidos.

Agradecimentos

Agradecemos à equipe de amostragem de ar e à servidora Lilian Maria Waquil Ferraro do setor de Geoprocessamento (GeoFEPAM) da Fundação Estadual de Proteção Ambiental do Rio Grande do Sul (FEPAM), à bolsista Aline Soares pela sua dedicação e comprometimento com a execução do trabalho, à Prefeitura de Santo Antônio da Patrulha, ao Núcleo de Assessoria Estatística do Instituto de Matemática da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

5. Referências

- ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT-NBR-9547). Material particulado em suspensão no ar ambiente. Determinação de concentração total pelo método do amostrador de grande volume [Brazilian Association of Technical Norms. Particulate material suspended in environmental air. Determination of total concentration by large-volume sampling method] Rio de Janeiro. 1988 (in-house report).
- ASHMORE, M.R.; DIMITROULOPOULOU, C. Personal exposure of children to air pollution. *Atmospheric Environment* 43(2009)128–141.
- BANU, B.; DANADEVI, K.; RAHMAN, M. Genotoxic effect of monocrotophos to sentil species using comet assay. *Food and Chemical Toxicology*, 36 (2001) 361–366.
- BERNSTEIN, L; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat. Res.* 97 (1982) 267–281.
- BINKOVÁ, B.; LEWTAS, J.; MISOVA, I.; PÖSSNER, P.; CERNÁ, M.; MRÁCKOVA, G.; *et al.* Biomarker studies in Northern Bohemia. *Environ Health Perspect* 4 (1996) 591–7.
- BONASSI, S.; COSKUN, E.; CEPPI, M.; LANDO, C.; BOLOGNESI, C.; BURGAZ, S.; HOLLAND, N.; KIRSH-VOLDERS, M.; KNASMUELLER, S.; ZEIGER, E.; *et al.*: The Human Micronucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat. Res.* 2011, 728 (3) 88–97.

- BRASIL, CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, Resolução CONAMA nº 003, 1990. Padrões Nacionais de Qualidade do ar, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, PP 15937–15939.
- BRITO, K.C.T.; LEMOS, C.T.; ROCHA, J.A.V.; MIELLI, A.C.; MATZENBACHER; VARGAS, V.M.F. Comparative genotoxicity of airborne particulate matter (PM_{2.5}) using *Salmonella*, plants and mammalian cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2013) 14–20.
- CALDERON-GARCIDUENAS, L.; OSNAYA, N.; RODRIGUEZ-ALCARAZ, A.; VILLARREAL-CALDERON, A. DNA damage in nasal respiratory epithelium from children exposed to urban pollution. *Environ Mol Mutagen* 30 (1997) 11–20.
- CLAXTON, L. D.; MATTHEWS, P; WARREN, S. The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: *Salmonella* mutagenicity. *Mutat Res.* 567 (2004) 347–399.
- CLAXTON, L. D.; WOODALL JR., G. M. A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. *Mutat Res.* 636 (2007) 36–94.
- CLIMATEMPO. Cinzas vulcânicas sobre o Sul do Brasil (2011). Disponível em: <http://www.climatempo.com.br/destaques/tag/porto-alegre/page/108/>.
- COLLINS, A.R.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C.C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23 (2008) 143–151.
- 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. Genetic biomonitoring of an urban population exposed to mutagenic airborne pollutants. *Environment International* 35 (2009) 1023–1029.
- CORONAS, MV. Área contaminada: avaliação da genotoxicidade ambiental e populacional, Tese de doutorado, Pós-graduação em Ecologia, UFRGS.

Orientadora: Dra. Vera Maria Ferrão Vargas, Co-orientadora: Profa. Dra. Daisy Maria Favero Salvadori, 2012, 140 páginas.

DE MARTINIS, B.S.; KADO, N.Y.; CARVALHO, L.R.F.; OKAMOTO, R.A.; GUNDEL, L.A. Genotoxicity of fractionated organic material in airborne particles from São Paulo, Brazil. *Mutat. Res.* 446 (1999) 83–94.

DE MARINI, D.; BROOKS, L.R.; WARREN, S.H.; KOBAYASHI, T.; GILMOUR, M.I.; SINGH, P. Bioassay-directed fractionation and Salmonella mutagenicity of automobile and forklift diesel exhaust particle. *Environmental Health Perspectives* 112 (2004) 814–819.

DIEM, E.; IVANCSITS, S.; RÜDIGER, H.W. Basal levels of DNA strand breaks in human leukocytes determined by comet assay, *J. Toxicol. Environ. Health* 65 (2002) 641–648.

DUCATTI, A.; VARGAS, V, M. F. Mutagenic activity of airborne particulate matter as an Indicative measure of atmospheric pollution. *Mutat. Res.* 540 (2003) 67–77.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The Human Micronucleus Project — an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.* 428 (1999) 271–283.

FRENZILLI, G.; BETTI, C.; DAVINI, T.; DESIDERI, M.; FORNAI, E.; GIANNESI, L.; MAGGIORELLI, F.; PAOLETTI, P.; BARALE, R. Evaluation of DNA damage in leukocytes of ex-smokers by single cell gel electrophoresis, *Mutat. Res.* 375 (1997) 117–123.

GAJSKI, G.; GERIC, M.; ORESCANIN, V.; GARAJ-VRHOVAC, V. Cytogenetic status of healthy children assessed with the alkaline comet assay and the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutation Research* 750 (2013) 55– 62.

- HEUSER, V.D.; ERDTMANN, B.; KVITKO, K.; ROHR, P.; SILVA, J. Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology* 232 (2007) 235–247.
- HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S.; *et al.* 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 (2008) 1–193.
- HOLLAND, N.; FUCIC, A.; MERLO, D.F.; SRAM, R.; KIRSCH-VOLDERS, M. Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. *Mutagenesis* 26 (2011) 51–56.
- HOLZ, O.; JÖRRES, R.; KÄSTNER, A.; KRAUSE, T.; MAGNUSSEN, H. Reproducibility of basal and induced DNA single-strand breaks detected by the single-cell gel electrophoresis assay in human peripheral mononuclear leukocytes, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 67 (1995) 305–310.
- HUEN, K., GUNN, L.; DURAMAD, P.; JENG, M.; SCALF, R.; HOLLAND, N. Application of a Geographic Information System to Explore Associations Between Air Pollution and Micronucleus Frequencies in African American Children and Adults. *Environ. and Molecular Mutagenesis* 47 (2006) 236–246.
- IARC, International Agency For Research On Cancer. Agents Classified by the IARC Monographs, vols. 1–102. IARC, Lyon, France (2010).
- IARC, International Agency For Research On Cancer, Monographs, Supplement (2012). Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>.
- IARC, International Agency For Research On Cancer. Outdoor air pollution a leading environmental cause of cancer deaths (2013). Disponível em: http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr221_E.pdf.

- IANISTICKI, M.; DALLAROSA, J.; SAUER, C.; TEIXEIRA, C. E.; DA SILVA, J. Genotoxic effect of polycyclic aromatic hydrocarbons in the metropolitan area or Porto Alegre, Brazil, evaluated by *Helix aspera* (Müller, 1974). *Environmental Pollution* 157 (2009) 2037–2042.
- IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=431760&idtema=110&search=rio-grande-do-sul|santo-antonio-da-patrolha|frota-2012> (2012).
- IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=431760&search=rio-grande-do-sul|santo-antonio-da-patrolha> (2013). (Acessado em 20 de outubro de 2013).
- JONES, I.M.; THOMAS, C.B.; TUCKER, B.; THOMPSON, C.L.; PLESHANOV, P.; VOROBTSOVA, I.; MOORE D.H. Impact of age and environment on somatic mutation at the HPRT gene of T lymphocytes in humans, *Mutat. Res.* 338 (1995) 129–139.
- KADO, N.; GUIRGUIS, G.; FLESSEL, C.; CHAN, R.; CHANG, K.; WESOLOWSKI, J. Mutagenicity of fine (less than 2.5 microns) airborne particles: diurnal variation in community air determined by a Salmonella micro preincubation (microsuspension) procedure. *Environ. Mutagen.* 8 (1986) 53–66.
- KAKIMOTO, H.; MATSUMOTO, Y.; SAKAI, S.; KANO, F.; ARASHIDANI, K.; TANG, N.; AKATSU, K.; NAKAJIMA, A.; AWATA, Y.; TORIBA, A.; KIZU, R.; HAYAKAWA, K. Comparison of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in an industrialized city (Kitakyushu) and two commercial cities (Sapporo and Tokio). *Journal of Health Science* 48 (2002) 370–375.

- KARAHALIL, B.; KARAKAYA, A.E.; BURGAZ, S. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 442 (1999) 29–35.
- LEMOS, A.T.; CORONA, M.V.; ROCHA, J.A.V.; VARGAS, V.M.F. Mutagenicity of particulate matter fractions in areas under the impact of urban and industrial activities. *Chemosphere* 89 (2012) 1126–1134.
- LIMA, E.F.; SOMMER, C.A.; SILVA, I.M.C.; NETTO, A.P.; LINDENBERG, M.; ALVES, R.C.M. Morfologia e química de cinzas do vulcão Puyehue depositadas na região metropolitana de Porto Alegre em junho de 2011. *Revista Brasileira de Geociências* 42 (2012) 265–280.
- LONG, C.M.; SUH, H.H.; KOBZIK, L.; *et al.* A pilot investigation of the relative toxicity of indoor and outdoor fine particles: in vitro effects of endotoxin and other particulate properties. *Environ Health Perspect* 109 (2001) 1019–1026.
- MAJER, B.J.; LAKY, B.; KNASMÜLLER, S.; KASSIE, F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat Res* 489 (2001) 147–72.
- MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113 (1983) 173–215.
- MEIRE, R.O.; AZEREDO, A.; TORRES, J.P.M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos [Ecotoxicological aspects of aromatic polycyclic hydrocarbons], *Oecol. Bras.* 11 (2007) 188–201 (in-house report).
- METSUL METEOROLOGIA. 2011. Cinzas vulcânicas cobrem o ConeSul. (2011) Disponível em: <http://www.metsul.com>.

- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella/microsome* mutagenicity assay. *Mut. Res.* 455 (2000) 29–60.
- NERI, M.; FUCIC, A.; KNUDSEN, L.E.; LANDO, C.; MERLO, F.; BONASSI, S. Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review. *Mutation Research* 544 (2003) 243–254.
- NERI, M.; BONASSI, S.; KNUDSEN, L. E.; SRAM, R. J.; HOLLAND, N.; UGOLINI, D.; MERLO, D.F. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage I. Overview and critical issues. *Mutation Research* 612 (2006a) 1–13.
- NERI, M.; MERLO, D.F.; UGOLINI, D.; BONASSI, S.; FUCIC, A.; HOLLAND, N.; KNUDSEN, E.; ŠRÁM, R.J.; CEPPI, M.; BOCCHINI, V. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage: II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutat. Res.* 612 (2006b) 14–39.
- PELEVINA, I.I.; ALESHCHENKO, A.V.; ANTOSHCHINA, M.M.; KUDRIASHOVA, O.V.; KURNESHOVA, L.E.; GOTLIB, V.; NOSKIN, L.A.; NOSKIN, V.A.; SEMENOVA, L.P.; SEREBRIANYI, A.M. Level of spontaneous and radiation-induced cytogenetic damage in blood lymphocytes of children depending on age and life style. *Radiats Biol Radioecol* 41 (2001) 573–579.
- PEREIRA, T.S. Biomonitoramento de populações humanas através de avaliação de genotoxicidade em área sujeita a risco ecotoxicológico. – Tese de doutorado, Pós-Graduação em Ecologia, UFRGS, Or.: Vera Vargas, coorientadora Dra. Daisy Salvadori. 2008, 148 páginas.
- 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. *Salmonella* mutagenicity

- assessment of airborne particulate matter collected from urban areas of Rio Grande do Sul State, Brazil, differing in anthropogenic influences and polycyclic aromatic hydrocarbon levels. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 702 (2010) 78–85.
- PEREIRA, T.S.; BELTRAMI, L.S.; ROCHA, J.A.V.; BROTO, F.P.; COMELLAS, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; VARGAS, V.M.F. Toxicogenetic monitoring in urban cities exposed to different airborne contaminants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 90 (2013) 174–182.
- REHWAGEN, M.; MULLER, A.; MASSOB, L.; HERBARTH, O.; RONCO, A. Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in a ambient air from urban and industrial areas. *Sci. Total Environ*. 348 (2005) 199–210.
- RUCHIRAWAT, M.; SETTACHANA, D.; NAVASUMRITA, P.; TUNTAWIROONA, J.; AUTRUPC, H. Assessment of potential cancer risk in children exposed to urban air pollution in Bangkok, Thailand. *Toxicology Letters* 168 (2007) 200–209.
- SALVI, S. Health effects of ambient air pollution in children. *Paediatric Respiratory Reviews* 8 (2007) 275–280.
- SÁNCHEZ-GUERRA, M.; PELALLO-MARTÍNEZ, N.; DÍAZ-BARRIGA, F.; ROTHENBERG, S.J.; HERNÁNDEZ-CADENA, L.; FAUGERON, S.; OROPEZA-HERNÁNDEZ, L.F.; QUINTANILLA-VEJA, B. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and DNA damage in Mexican children. *Mutation Research* 742 (2012) 66–71.
- SHANNIGRAHI, A.S., FUKUSHIMA, T., OZAKI, N. Comparison of different methods for measuring dry deposition fluxes of particulate matter and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the ambient air. *Atmospheric Environ*. 39 (2005) 653–662.

- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175 (1988) 184–91.
- SINGH, N.P. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mut. Res.* 455 (2000) 11–127.
- SISENANDO, H.A.; MEDEIROS, S.R.B.; ARTAXO, P.; SALDIVA, P.H.N.; HACON, S.S. Micronucleus frequency in children exposed to biomass burning in the Brazilian Legal Amazon region: a control case study. *Oral Health* (2012) 12:6.
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay (Single Cell Gel Test): a sensitive genotoxicity test for detection of DNA damage and repair. In: Henderson, D.S. (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 113 (1999). DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems. Human Press Inc., Totowa, New York.
- SRAM, R.J.; BINKOVA, B.; DOSTAL, M.; MERKEROVA-DOSTALOVA, M.; LIBALOVA, H.; MILCOVA, A.; ROSSNER, P.; ROSSNEROVA, A.; SCHMUCZEROVA, J.; SVECOVA, V.; TOPINKA, J.; VOTAVOVA, H. Health impact of air pollution to children. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 216 (2013) 533–540.
- SUK, W.A.; MURRAY, K.; AVAKIAN, M.D. Environmental hazards to children's health in the modern world. *Mutation Research* 544 (2003) 235–242.
- THOMAS, P.; HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S.; FENECH, M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* vol.4 n°.6 (2009) 825–837.
- TOLBERT, P.; SHY, C.; ALLEN, J. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res.*, 271 (1992) 69-77.

UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V.M.F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) com indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. [Mutagenicity test of *Salmonella typhimurium* (Ames test) as potential carcinogenicity indicator in mammals]. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E. K. (Orgs.) Mutagênese ambiental. Canoas: Ed. ULBRA (2003) 356 páginas.

VALVERDE, M.; DELCARMENLOPEZ, M.; LOPEZ, I.; SANCHEZ, I.; FORTOUL, T.I.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; *et al.* DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. *Environ. Mol. Mutagen.* 30 (1997) 147–52.

VARGAS, V.M.F.; HORN, R.C.; GUIDOBONO, R.R., MITTELSTAEDT, A.B., AZEVEDO, I.G. Mutagenic activity of airborne particulate matter from the urban area of Porto Alegre, Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 21 (1998) 247–253.

VARGAS, V. M. F. *Mutagenic activity as a parameter to asses ambient air quality for protection of the environment and human health.* *Mutation Research* 544 (2003) 313–319.

VARGAS, V.M.F.; BRITO, K.C.T.; CORONAS, M.V. Genetic biomarkers applied to environmental air quality: ecological and human health aspects. In Mazzeo, N.A. (Ed.), *Air Quality Monitoring, Assessment and Management.* (2011) Intech open access publisher, intechweb.org, <http://www.intechopen.com.br/books/air-quality-monitoring-assessment-and-management>.

VASCONCELOS, P.C.; ZACARIAS. D.; PIRES, M.A.F., POOL, C.S.; CARVALHO, L.R.F. Measurements of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particles

from the metropolitan area of São Paulo City, Brazil. *Atmos. Environ.* 37 (2003) 3009–3018.

WATANABE, M.; ISHIDATE JR., M.; NOHMI, M.T. A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. *Mutat. Res.* 216 (1989) 211–220.

WHO, World Health Organization. Health Guidelines for air quality. 2000. Geneva, World Health Organization (WHO/SDE/OEH/00.02).

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

WHO, World Health Organization. Review of evidence on health aspects of air pollution-REVIHAAP PROJECT: Technical Report, 2013.

YUNKER, M.B.; MACDONALD, R.W.; VINGARZAN, R.; MITCHELL, H.; GOYETTE, D.; SYLVESTRE, S. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Org. Geochem.* 33(2002) 489–515.

3. Considerações finais

A crescente urbanização e industrialização tem como consequência a produção de substâncias genotóxicas e/ ou carcinogênicas que afetam a saúde e a integridade dos ecossistemas. Cerca de 15.000 compostos químicos foram desenvolvidos ao redor do mundo nos últimos 50 anos, incluindo pesticidas, metais, solventes e substâncias neurotóxicas que podem levar à morte. Estes compostos ainda não são totalmente conhecidos em relação a sua toxicidade e têm potencialidade de se disseminar no ambiente (Suk *et al.*, 2003).

Além da natureza altamente complexa e variável de poluentes liberados no compartimento atmosférico provenientes de fontes específicas, deve-se considerar a ocorrência de reações que geram novos compostos. Ainda, o material particulado liberado de diversas fontes de poluentes do ar pode ser transportado por milhares de quilômetros através da atmosfera, podendo permanecer por um longo período de tempo (Claxton *et al.*, 2004). Todos estes fatores dificultam o estabelecimento de áreas que possam ser caracterizadas como referência para poluição do ar.

A presença de contaminantes no ar evidencia a importância de investigar se os poluentes, tais como os HPAs, estão resultando em efeitos genotóxicos sobre a saúde das crianças (Mielzyńska *et al.*, 2006). Níveis baixos de poluentes encontrados em áreas de referência têm mostrado resultados positivos para mutagênese do ar, especialmente relacionada à MP2,5. Estas partículas podem penetrar profundamente no trato respiratório, aumentando a ação genotóxica (Brito *et al.*, 2013; Claxton *et al.*, 2004; Vargas *et al.*, 2011). A legislação brasileira, no entanto, não define níveis para MP2,5, sendo que os limites utilizados são os estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde. Estudos sistemáticos, em dimensões globais, são necessários, pois há registro de mais de 1,3

milhões de novos casos de câncer de pulmão por ano em todo o mundo, devido às substâncias cancerígenas presentes no ar (IARC, 2013).

Especificamente em relação às crianças, os estudos ambientais devem levar muitos fatores em consideração, uma vez que, comparadas a adultos, estão expostas a padrões diferentes de exposição, recebem doses diárias maiores de agentes tóxicos, incluindo os cancerígenos, e podem apresentar diferenças quanto à detoxificação e aos processos de reparo. Todos esses fatores sugerem abordagens específicas para a avaliação da exposição das crianças. Além dessas considerações, há aspectos secundários que também direcionam para a importância de estudos regionais, pois existem diferentes tipos de exposição, tais como o nível de tráfego de veículos automotores, estilo de vida, dieta, questões socioeconômicas, etnia e suscetibilidade genética (Neri *et al.*, 2006a). Entretanto, o número de estudos envolvendo avaliação de danos genéticos em crianças expostas à poluição do ar ainda é limitado, não só no Brasil, como no mundo todo.

Por estes motivos, o presente estudo avaliou a atividade mutagênica em extratos orgânicos de material particulado inalável (MP2,5), como marcador de exposição ambiental em área considerada de referência para poluição do ar e aplicou biomarcadores genéticos que permitiram verificar sinais precoces de exposição a agentes mutagênicos em população de crianças. Os resultados positivos para a mutagenicidade do ar, obtidos com o uso do ensaio *Salmonella*/microsoma neste estudo, bem como a presença de teores de HPAs, podem estar associados a uma elevação do fluxo de veículos que vem ocorrendo nos últimos anos no município analisado. Ainda, embora os resultados dos ensaios cometa e micronúcleo no biomonitoramento estejam em sua maioria dentro dos limites apresentados em vários estudos realizados em áreas de referência para poluição do ar, alguns parâmetros se mostraram mais elevados. Esses dados remetem a questionamento

das dificuldades na definição de áreas de referência para poluição do ar e biomonitoramento humano, incluindo a região investigada.

A diversidade genética da população humana permite que os indivíduos variem em relação à suscetibilidade a doenças. Dessa forma, uma melhor compreensão das influências genéticas sobre a resposta ambiental poderia levar à identificação de fatores de riscos à saúde, fornecendo uma base para a prevenção de doenças e propiciando a elaboração de programas de intervenção precoce, principalmente em populações de maior risco e, especialmente, em crianças.

A OMS, em recente publicação, destacou a necessidade de revisão dos limites estabelecidos (WHO, 2006) para material particulado, ozônio, NO₂ e SO₂, recomendando que sejam realizadas revisões regulares a respeito desses valores a fim de reavaliá-los, uma vez que há evidências de que a poluição do ar afeta a saúde da população humana (WHO, 2013). No entanto, apesar de atualmente a poluição do ar ter sido classificada como cancerígena (Grupo 1), ainda não existem novos limites estabelecidos (IARC, 2013).

Neste contexto, fica evidente a importância de realização de estudos envolvendo biomonitoramento genético associado à mutagenicidade do compartimento atmosférico, principalmente em população de crianças, pois são mais suscetíveis, e, especialmente em áreas de referência, para que sejam estabelecidos limites basais que poderão ser utilizados na comparação com estudos realizados em áreas influenciadas e impactadas por atividades antrópicas. Adicionalmente, a revisão dos limites vigentes para emissões de poluentes no ar é necessária, pois, segundo a OMS (2013) efeitos à saúde têm ocorrido, em alguns casos, em concentrações menores de poluentes do ar do que aquelas estabelecidas como limites.

4. Referências

- AKCHA, F.; IZUEL, C.; BUDZINSKI, H.; BURGEOT, T.; NARBONNE, J.F. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in B[a]P-contaminated mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 49 (2000) 269–287.
- BINKOVA, B.; LEWTAS, J.; MISOVA, I.; PÖSSNER, P.; CERNÁ, M.; MRÁCKOVA, G.; *et al.* Biomarker studies in Northern Bohemia. *Environ Health Perspect* 4 (1996) 591–597.
- BONASSI, S.; COSKUN, E.; CEPPI, M.; LANDO, C.; BOLOGNESI, C.; BURGAZ, S.; HOLLAND, N.; KIRSH-VOLDERS, M.; KNASMUELLER, S.; ZEIGER, E.; *et al.*: The Human MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat. Res.* 2011, 728 (3) 88–97.
- BRASIL, CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, Resolução CONAMA nº 003, 1990. Padrões Nacionais de Qualidade do ar, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 15937–15939.
- BRITO, K.C.T.; LEMOS, C.T.; ROCHA, J.A.V.; MIELLI, A.C.; MATZENBACHER, C.; VARGAS, V.M.F. Comparative genotoxicity of airborne particulate matter (PM_{2.5}) using *Salmonella*, plants and mammalian cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2013) 14–20.
- BURLINSON, B.; TICE, R.R.; SPEITZ, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAABE, S.Y.; COLLINS, A.R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, S.T.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y.F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.;

- HARTMANN, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat. Res.* 627 (2007) 31–35.
- CLAXTON, L.D.; MATTHEWS, P.; WARREN, S. The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: *Salmonella* mutagenicity. *Mutat. Res.* 567 (2004) 347–399.
- CLAXTON, L.D.; WOODALL JR., G.M. A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. *Mutat. Res.* 636 (2007) 36–94.
- COLLINS, A.R.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C.C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23 (2008) 143–151.
- 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. Genetic biomonitoring of an urban population exposed to mutagenic airborne pollutants. *Environment International* 35 (2009) 1023–1029.
- CORONAS, M.V. Área contaminada: avaliação da genotoxicidade ambiental e populacional, Tese de doutorado, Pós-graduação em Ecologia, UFRGS. Orientadora: Dra. Vera Maria Ferrão Vargas, Co-orientadora: Profa. Dra. Daisy Maria Favero Salvadori, 2012, 140 páginas.
- DE MARTINIS, B.S.; KADO, N.Y.; CARVALHO, L.R.F.; OKAMOTO, R.A.; GUNDEL, L.A. Genotoxicity of fractionated organic material in airborne particles from São Paulo, Brazil. *Mutat. Res.* 446 (1999) 83–94.
- DUCATTI, A.; VARGAS, V, M. F. Mutagenic activity of airborne particulate matter as an Indicative measure of atmospheric pollution. *Mutat. Res.* 540 (2003) 67–77.

- GAJSKI, G.; GERIC, M.; ORESCANIN, V.; GARAJ-VRHOVAC, V. Cytogenetic status of healthy children assessed with the alkaline comet assay and the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutation Research* 750 (2013) 55– 62.
- GALLO, V.; KHAN, A.; GONZALES, C.; PHILLIPS, D.V.; SCHOKET, B.; GYÖRFFY, E.; ANNA, L.; KOVÁCS, K.; MØLLER, P.; LOFT, S.; KYRTOPOULOS, S.; MATULLO, G.; VINEIS, P. Validation of biomarkers for the study of environmental carcinogens: a review. *Biomarkers* 2008; 13 (2008) 505–534.
- HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S.; *et al.* 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 (2008) 1–193.
- HUEN, K.; GUNN, L.; DURAMAD, P.; JENG, M.; SCALF, R.; HOLLAND, N. Application of a Geographic Information System to Explore Associations Between Air Pollution and Micronucleus Frequencies in African American Children and Adults. *Environ. and Molecular Mutagenesis* 47 (2006) 236–246.
- IARC, International Agency For Research On Cancer. Agents Classified by the IARC Monographs, vols. 1–102. IARC, Lyon, France (2010).
- IARC, International Agency For Research On Cancer. Outdoor air pollution a leading environmental cause of cancer deaths (2013). Disponível em: http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr221_E.pdf.
- IANISTICKI, M.; DALLAROSA, J.; SAUER, C.; TEIXEIRA, C. E.; DA SILVA, J. Genotoxic effect of polycyclic aromatic hydrocarbons in the metropolitan area or Porto Alegre, Brazil, evaluated by *Helix aspera* (Müller, 1974). *Environmental Pollution* 157 (2009) 2037–2042.

- LEWTAS, J. Air pollution combustion emissions: Characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutation Research* 636 (2007) 95–133.
- MEIRE, R.O.; AZEREDO, A.; TORRES, J.P.M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos [Ecotoxicological aspects of aromatic polycyclic hydrocarbons]. *Oecol. Bras.* 11 (2007) 188–201 (in-house report).
- MIELZYŃSKA, D.; SIWINSKA, E.; KAPKA, L.; SZYFTER, K.; KNUDSEN, L.E.; MERLO, D.F. The influence of environmental exposure to complex mixtures including PAHs and lead on genotoxic effects in children living in Upper Silesia, Poland, *Mutagenesis*, 2006, Vol.21(5) 295–304.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella/microsome* mutagenicity assay. *Mut. Res.* 455 (2000) 29–60.
- NERI, M.; BONASSI, S.; KNUDSEN, L.E.; SRAM, R.J.; HOLLAND, N.; UGOLINI, D.; MERLO, D.F. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage I. Overview and critical issues. *Mutat. Res.* 612 (2006a) 1–13.
- NERI, M.; MERLO, D.F.; UGOLINI, D.; BONASSI, S.; FUCIC, A.; HOLLAND, N.; KNUDSEN, E.; ŠRÁM, R.J.; CEPPI, M.; BOCCHINI, V. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage: II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutat. Res.* 612 (2006b) 14–39.
- PAPAGEORGOPOULOU, A.; MANOLI, E.; TOULOUMI, E.C.; SAMARA, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air of greek towns in relation to other atmospheric pollutants. *Chemosphere*, 39 (1999) 2183–2199.
- PEREIRA, T.S. Biomonitoramento de populações humanas através de avaliação de genotoxicidade em área sujeita a risco ecotoxicológico. – Tese de doutorado, Pós-

- Graduação em Ecologia, UFRGS, Or.: Vera Vargas, coorientadora Dra. Daisy Salvadori. 2008, 148 páginas.
- 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. Salmonella mutagenicity assessment of airborne particulate matter collected from urban areas of Rio Grande do Sul State, Brazil, differing in anthropogenic influences and polycyclic aromatic hydrocarbon levels. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 702 (2010) 78–85.
- PEREIRA, T.S.; BELTRAMI, L.S.; ROCHA, J.A.V.; BROTO, F.P.; COMELLAS, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; VARGAS, V.M.F. Toxicogenetic monitoring in urban cities exposed to different airborne contaminants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 90 (2013) 174–182.
- PIERCE, R.C.; KATZ, M. Dependency of Polynuclear Aromatic Hydrocarbon content on size distribution of atmospheric aerosols. *Environ. Sci. Technol.* 9 (1975) 347–353.
- ROMA-TORRES, J.; TEIXEIRA, J.P.; SILVA, S.; LAFFON, B.; CUNHA, L.M.; MÉNDEZ, J.; *et al.* Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. *Mutat. Res.* 604 (2006) 19–27.
- RUCHIRAWAT, M.; SETTACHANA, D.; NAVASUMRITA, P.; TUNTAWIROONA, J.; AUTRUPC, H. Assessment of potential cancer risk in children exposed to urban air pollution in Bangkok, Thailand. *Toxicology Letters* 168 (2007) 200–209.
- SALVI, S. Health effects of ambient air pollution in children. *Paediatric Respiratory Reviews* 8 (2007) 275–280.
- SCHWENK, M.; GUNDERT-REMY, U.; HEINEMEYER, G.; OLEJNICZAK, K.; STAHLMANN, R.; KAUFMANN, W.; BOLT, H.M.; GREIM, H.; VON

- KEUTZ, E.; GELBKE, H.P. Children as a sensitive subgroup and their role in regulatory toxicology: DGPT workshop report. *Arch. Toxicol.* 77 (2003) 2–6.
- SISENANDO, H.A.; MEDEIROS, S.R.B.; ARTAXO, P.; SALDIVA, P.H.N.; HACON, S.S. Micronucleus frequency in children exposed to biomass burning in the Brazilian Legal Amazon region: a control case study. *Oral Health* (2012) 12:6.
- SRAM, R.J.; PODRAZILOVA, K.; DEJMEK, J.; MRACKOVA, G.; PILCIK, T. Single cell gel electrophoresis assay: sensitivity of peripheral white blood cells in human population studies. *Mutagenesis* 13 (1998) 99–103.
- SUK, W.A.; MURRAY, K.; AVAKIAN, M.D. Environmental hazards to children's health in the modern world. *Mutat. Res.* 544 (2003) 235–242.
- THOMAS, P.; HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S.; FENECH, M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* vol.4 n°.6 (2009) 825–837.
- TOLBERT, P.; SHY, C.; ALLEN, J. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res.*, 271 (1992) 69–77.
- VALVERDE, M.; DELCARMENLOPEZ, M.; LOPEZ, I.; SANCHEZ, I.; FORTOUL, T.I.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; *et al.* DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. *Environ Mol Mutagen* 30 (1997) 147–52.
- VARGAS, V.M.F.; HORN, R.C.; GUIDOBONO, R.R.; MITTELSTAEDT, A.B.; AZEVEDO, I.G. Mutagenic activity of airborne particulate matter from the urban area of Porto Alegre, Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 21 (1998) 247–253.
- VARGAS, V.M.F. *Mutagenic activity as a parameter to asses ambient air quality for protection of the environment and human health.* *Mutat. Res.* 544 (2003) 313–319.

- VARGAS, V.M.F.; BRITO, K.C.T.; CORONAS, M.V. Genetic biomarkers applied to environmental air quality: ecological and human health aspects. In Mazzeo, N.A. (Ed.), *Air Quality Monitoring, Assessment and Management*. (2011) Intech open access publisher, intechweb.org, <http://www.intechopen.com.br/books/air-quality-monitoring-assessment-and-management>.
- VINEIS, P.; HUSGAFVEL-PURSIAINEN, K. Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis* 26 (2005) 1846–55.
- WHO, World Health Organization. *Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. Global update 2005*, Geneva, 2006.
- WHO, World Health Organization. *Review of evidence on health aspects of air pollution-REVIHAAP PROJECT: Technical Report*, 2013.
- WILD, C.P.; KLEINJANS, J.; Children and increased susceptibility to environmental carcinogens: evidence or empathy? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12 552 (2003) 1389–1394.

Apêndices

Apêndice A – Termo de Consentimento e Questionário

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

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

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

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

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

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

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

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

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

Declaro ainda que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Data ___/___/_____

Assinatura do voluntário

Vera Maria Ferrão Vargas

Pesquisadora Responsável

QUESTIONÁRIO

Data ___/___/_____

I – Identificação**Identificação do informante responsável**

Nº de registro: _____

Nome: _____

Identidade: _____ Profissão: _____

Data de nascimento: ___ / ___ / _____

Idade: _____

Endereço: _____

CEP: _____ - _____ Telefone para contato: _____

Grau de parentesco com a criança: _____

Identificação da criança

Nº de registro: _____

Nome: _____

Data de nascimento: ___ / ___ / _____

Idade: _____

Sexo: M F

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

Endereço: _____

CEP: _____ - _____ Telefone: _____

Nº de registro do voluntário no estudo: _____

II – Criança, mãe e pai biológicos.

1. A <CRIANÇA> vive com:

(1) mãe biológica (2) mãe adotiva (3) outro: _____
2. A <CRIANÇA> nasceu no Brasil:

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

SE NÃO Em qual país? _____
3. Qual a idade da mãe biológica? _____
4. Cor da mãe biológica (1) Branca (2) Negra (3) Mulata (4) Amarela (5) Outros
5. A mãe biológica nasceu no Brasil:

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

SE NÃO Em qual país? _____
6. Cor do pai biológico (1) Branco (2) Negro (3) Mulato (4) Amarelo (5) Outros
7. O pai biológico nasceu no Brasil:

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

SE NÃO Em qual país? _____
8. <CRIANÇA> tem irmão/irmã gêmeo?

(1) sim (2) não (8) não sabe (9) não respondeu
9. Quantos filhos a mãe biológica tem?

_____ filhos (8) não sabe (9) não respondeu
10. A mãe biológica tem algum filho que já tenha falecido?

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

SE SIM: Foi no parto? (1) sim (2) não (8) não sabe (9) não respondeu

Outra causa? (1) sim (2) não (8) não sabe (9) não respondeu

Qual? _____ (8) ns (9) nr
11. Você: (0) vive com companheiro (a) / casada (o) (1) solteira (o) (2) viúva (o) (3) desquitada (o) / divorciada(o) (9) não respondeu

12. A <CRIANÇA> vai à escola?

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

SE SIM: Em que escola? _____ Local: _____

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

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

(8) não sabe (9) não respondeu

III – Gestaçã o e primeiros meses

14. Durante a gravidez a mã e biológ ica 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 mã e biológ ica fumou?

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

16. A mã e biológ ica trabalhou fora (ou para fora) durante a gestaçã o?

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

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

Qual a sua ocupaçã o? _____ (8) ns (9) nr

17. **SE SIM:** Nesse seu trabalho as pessoas costumavam fumar na mesma sala/ local em que a mã e biológ ica 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 mã e ficou grávida? (1) sim (2) não

(8) não sabe (9) não respondeu

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

Qual a sua ocupaçã o? _____ (8) ns (9) nr

19. Durante a gravidez a mã e biológ ica foi exposta à radiaçã o (fez algum raio-x para diagnóst ico 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 ultima 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 ultima 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. Consume 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: _____

Frequência: _____

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

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

SE SIM Qual?

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

Nome da medicação: _____

Frequência: _____

Há quanto tempo deixou? _____

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

(1) Sim (2) Não

SE SIM: O quê? _____

73. A <criança> alimenta-se de:

Alimentos construtores:

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

Alimentos reguladores:

() verduras () frutas () legumes

Carboidratos:

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

Apêndice B – Parecer do Comitê de Ética



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

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

Projeto: 07-042

Pesquisador Responsável:
VERA MARIA FERRÃO VARGAS

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

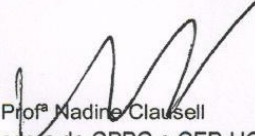
TCLE PARA ESTUDO COM POPULAÇÃO DE CRIANÇAS (5 A 12 ANOS)

Data da Versão:

29/01/2009

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

Porto Alegre, 29 de janeiro de 2009.


Prof. Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA