



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS ARARANGUÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENERGIA E SUSTENTABILIDADE

RAHISA SCUSSEL

**AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E TOXICOLÓGICA DE LIXIVIADO DE CINZAS
PESADAS PROVENIENTES DA COMBUSTÃO DE MADEIRA TRATADA COM
ARSENIATO DE COBRE CROMATADO TIPO C**

ARARANGUÁ
2020

RAHISA SCUSSEL

**AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E TOXICOLÓGICA DE LIXIVIADO DE CINZAS
PESADAS PROVENIENTES DA COMBUSTÃO DE MADEIRA TRATADA COM
ARSENIATO DE COBRE CROMATADO TIPO C**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Energia e Sustentabilidade da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Energia e Sustentabilidade

Orientador: Professor Dr. Claus Tröger Pich.

Coorientador: Professor Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila.

ARARANGUÁ

2020

Ficha de identificação da obra

Scussel, Rahisa

AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E TOXICOLÓGICA DE LIXIVIADO DE CINZAS PESADAS PROVENIENTES DA COMBUSTÃO DE MADEIRA TRATADA COM ARSENIATO DE COBRE CROMATADO TIPO C / Rahisa Scussel ; orientador, Claus Tröger Pich, coorientador, Ricardo Andrez Machado de Ávila, 2020.

73 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Araranguá, Programa de Pós-Graduação em Energia e Sustentabilidade, Araranguá, 2020.

Inclui referências.

1. Energia e Sustentabilidade. 2. combustão de madeira. 3. arseniato de cobre cromatado. 4. ecotoxicologia. 5. genotoxicologia. I. Tröger Pich, Claus. II. Machado de Ávila, Ricardo Andrez. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Energia e Sustentabilidade. IV. Título.

Rahisa Scussel
AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E TOXICOLÓGICA DE LIXIVIADO DE CINZAS
PESADAS PROVENIENTES DA COMBUSTÃO DE MADEIRA TRATADA COM
ARSENIATO DE COBRE CROMATADO TIPO C

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Kátia Cilene Rodrigues Madruga, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Elidio Angioletto, Dr.
Universidade do Extremo Sul Catarinense

Prof. Paulo Emílio Feuser, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de mestre em Energia e Sustentabilidade.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Claus Tröger Pich, Dr.
Orientador

Araranguá, 2020.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao meu pai, Vilmar Scussel, meu primeiro professor, que, por meio de brincadeiras de “escolinha”, me alfabetizou e assim o fez com meus irmãos. Pai, muito obrigada! Agradeço em igual e infinitamente à minha mãe, Valdelir Luiz, que nunca mediu esforços para que eu chegasse até aqui. Por tudo o que sou e me formei, muito obrigada mãe! Igualmente agradeço aos meus irmãos, Wendy, Irina, Taivan e Caroline Scussel, e à minha sobrinha Natasha Scussel Schwartz, por se fazerem sempre presentes, mesmo se distantes fisicamente, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim, me ajudando e me confortando em momentos difíceis. A vocês, muito obrigada! Agradeço ao Dr. Júlio César Alves da Luz, por me inspirar a vida acadêmica, por ser tão prestativo e amável, sempre disposto a ajudar, como um irmão mais velho. Muito obrigada!

Agradeço infinitamente ao meu noivo, Henrique Pavanatti Joaquim, que faz meu dia a dia feliz, por me apoiar em todas as minhas escolhas, sem nenhuma dúvida, se manteve ao meu lado mesmo durante as crises de choro, raiva e desespero perante os desafios desta jornada. A você, Amor, muito obrigada!

Agradeço aos meus amigos Aline Cardoso, Lê Benincá e Paulo Roberto Domingos, que fazem meus dias muito mais felizes, que me proporcionaram inúmeros momentos divertidos e alegres nesses últimos dois anos. Eles, mesmo sem saberem exatamente o que é a minha pesquisa, nunca duvidaram do meu trabalho, e sim o apoiaram e me deram forças e incentivo para que eu acreditasse mais em mim e na minha capacidade. Por isso, sou eternamente grata!

Agradeço ao professor Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila por ter apoiado a minha escolha, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa e como técnica no Laboratório Multiusuários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – MULTILAB. Agradeço por toda a sua inestimável ajuda desde a iniciação científica, agradeço por todos os “puxões de orelha” necessários para que eu melhorasse enquanto ser humano e profissional, porque, para mim, você é exemplo destes. Muito obrigada, prof.!

Agradeço ao meu professor orientador, Dr. Claus Tröger Pich, por ter aceitado me orientar, por toda a dedicação durante este processo em prol da qualidade do nosso trabalho e por desenvolver uma ciência séria e de qualidade, e por todo apoio e crédito em meu trabalho. Muito obrigada!

Agradeço ao professor Dr. Elidio Angioletto, e a todos os seus alunos, em especial à Ana Carolina Feltrin, por toda a ajuda nos experimentos, ajuda e trabalho em conjunto, pela correção de inglês, Hilária, Silvia, Bianca, à Dra. Geovana Savi, por todo o apoio e acolhimento no LADEBIMA. Vocês foram essenciais para que eu pudesse desenvolver o meu trabalho, sem vocês nada disso seria realidade. Meus sinceros agradecimentos!

Agradeço à Nathália Coral Galvani, por ser uma pessoa incrível e prestativa, por me ajudar nos ensaios cometa, e especialmente por acreditar que daria certo, por viver comigo as glórias e desafios desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos para Mírian Ívens Fagundes, que comigo compartilha características e pensamentos semelhantes, que com sua serenidade sempre me compreendeu, me inspirou, sendo uma amiga inestimável. Agradeço-lhe por todo o afeto, acolhimento, pelos momentos de sorrisos e estresses, e por toda a ajuda nos ensaios de hemólise. Agradeço de coração à amiga Bethina Trevisol Steiner, que sempre me acolheu e entendeu minhas razões e escolhas, que me apoia e me dá forças e inspiração para seguir em frente. E agradeço a amizade, o companheirismo e o carinho da Daysi de Oliveira, que apesar de termos praticamente a mesma idade, ela me acolhe como uma irmã mais velha, com os conselhos mais simples e maduros, que nortearam as escolhas certas. Por toda tua ajuda no laboratório e pela tua presença, muito obrigada! E ainda agradeço aos meus demais amigos do grupo de Pesquisa em Biotecnologia, aqueles que estão comigo diariamente, sorrindo e chorando, comemorando e reclamando, me fortificando e me fazendo crescer muito enquanto humano e profissional, especialmente à Dra. Flávia Rigo e ao Gabriel Paulino, agradeço imensamente pela oportunidade de tê-los em minha vida, pelas suas amizades.

Agradeço ao Dr. Paulo Emílio Feuser, por todo o apoio nos ensaios *in vitro*, com células e ensaio de hemólise, por toda a sua inestimável ajuda técnico-científica e pelos momentos mais divertidos em laboratório, e, claro, por todas as caronas! Meus agradecimentos aos meus amigos de curso, os(as) engenheiros(as) mais divertidos(as), Amarfeina Oliveira, Fernanda Dagostin, Francine Schmoeller, Vitor Savi e Tiago Silvestrini, com vocês cada dia neste curso foi gratificante, desafiador, divertido e emocionante.

Por fim, agradeço o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

RESUMO

A madeira é um insumo largamente utilizado, tanto para a construção civil, quanto para a fabricação de móveis, a indústria naval e como recurso energético. A aplicação para alguns dos fins supracitados necessita que a madeira possua características de elevada durabilidade e resistência. Nesse sentido, tratamentos preservativos que fornecem tais características têm sido amplamente utilizados. Um tradicional tratamento preservativo de madeira é a formulação arseniato de cobre cromatado (CCA), a qual foi popularizada a partir da década de 1970. Sua composição inclui cobre (CuO), cromo (CrO₅) e arsênio (As₂O₅), revelando elevado potencial tóxico. O potencial tóxico destas pode ser incrementado quando a madeira tratada com CCA é utilizada como combustível, pois há emissões de quantidades significativas de arsênio, conhecidamente carcinogênico, e estas cinzas também concentram cromo com significativa toxicidade. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar, o efeito ecotóxico e genotóxico de cinzas pesadas provenientes da combustão de madeira tratada com arseniato de cobre cromatado tipo C e de madeira não tratada, em diferentes modelos experimentais (bioindicadores). As cinzas foram produzidas por ensaio de queima, e os lixiviados produzidos conforme ABNT, NBR 10005 de 2004, com adaptações. A análise físico-química mostrou altos teores de arsênio e cromo, 59,45 e 54,28 mg/L, respectivamente, no lixiviado de cinzas de madeira tratadas (LCPMT-CCA), e 0,70 mg/L, 0,30 mg/L foram encontrados no lixiviado de cinzas de madeira não tratada (LCPMNT), respectivamente. Nenhum teor significativo de cobre foi encontrado nos lixiviados, entretanto as cinzas brutas de madeira tratada com CCA possuíam significativo teor de cobre, o que sugere que a lixiviação deste metal não foi possível com água ultrapura. O LCPMT-CCA causou toxicidade significativa em plantas superiores (*Lactuca sativa L.* e *Allium cepa L.*), com efeitos agudos e subagudos, e no microcrustáceo *Artemia spp.* (CL50 = 24,62%). No DNA das células NIH3T3, concentrações de 2% e 5% apresentaram aumento significativo na Frequência de Danos (DF) e no Índice de Danos (DI) e, e apresentaram uma diminuição linear significativa na viabilidade celular em concentrações a partir de 2%, verificada pelo ensaio MTT. Ambos os lixiviados causaram hemólise em eritrócitos humanos nas concentrações de 75% e 90%. Porém, alterações morfológicas destes foram verificadas por citometria de fluxo nos eritrócitos expostos ao LCPMT-CCA em concentrações menores como 25 e 50%. Os resultados obtidos durante os ensaios ecotoxicológicos, MTT, cometa e na hemólise in vitro, sugerem que o teor de arsênio e cromo do LCPMT-CCA desempenha um papel importante nos efeitos ecotóxicos, tóxicos e genotóxicos provocados pelo mesmo, e seu possível mecanismo de toxicidade envolve estresse oxidativo resultante do dano ao DNA, promovido pela metabolização dos compostos do CCA, As e Cr. Entretanto, esses efeitos não foram desencadeados pelo LCPMNT.

Palavras-chave: combustão de madeira; arseniato de cobre cromatado; ecotoxicologia; lixiviação; genotoxicologia.

ABSTRACT

Wood is a widely used input, both for construction, furniture manufacturing, shipbuilding, and even as an energy resource. The wood needs characteristics of high durability and resistance for the above mentioned purposes. In this sense, preservative treatments that provide such characteristics have been widely used. A traditional preservative treatment of wood is the chromium copper arsenate (CCA) formulation which has been popularized since the 1970s. Its composition includes copper (CuO), chromium (CrO₅), and arsenic (As₂O₅), revealing high toxic potential. Their toxic potential can be increased when CCA-treated wood is used as fuel. Emissions of significant amounts of arsenic, known to be carcinogenic, occur and these ashes also concentrate chromium with significant toxicity. Therefore, it was evaluated, ecotoxic, toxic and genotoxic potentials of bottom ash leachate originated from the combustion of CCA-treated wood compared to untreated one. The ashes were produced by burning test, and the leachate produced according to ABNT, NBR 10005 of 2004, with adaptations. The physicochemical analysis showed high levels of arsenic and chromium, 59.45 and 54.28 mg/L, respectively, in CCA-treated wood ash leachate (CCA-TWBAL), and 0.70 mg/L, 0.30 mg/L were found in untreated wood ash leachate (UWBAL), respectively. No significant copper content was found in the leachate. However, the raw wood ashes treated with CCA had a significant copper content, suggesting that the leaching of this metal was not possible with ultrapure water. CCA-TWBAL caused significant toxicity in higher plants (*Lactuca sativa L.* and *Allium cepa L.*) with acute and subacute effects and in microcrustacean *Artemia spp.* (LC₅₀ = 24.62%). In NIH3T3 cell DNA, concentrations of 2% and 5% showed a significant increase in Damage Index (DI) and Damage Frequency (DF), respectively, and showed a significant linear decrease in cell viability at concentrations from 2%, verified by the MTT test. Both leachate caused hemolysis in human erythrocytes at concentrations of 75% and 90%. Nevertheless, morphological alterations of these were verified by flow cytometry in erythrocytes exposed to CCA-TWBAL at concentrations of 25% and 50%. The results obtained during the ecotoxicological assays, MTT assay, comet assay and finally *in vitro* hemolysis, suggest that the leached arsenic and chromium content plays an important role in the ecotoxic, toxic and genotoxic effects caused by CCA-TWBAL, and its possible mechanism of toxicity involves oxidative stress resulting DNA damage, promoted by the metabolization of CCA compounds, As and Cr. These effects were not triggered by UWBAL.

Keywords: wood combustion; chromium copper arsenate; ecotoxicology; leaching; genotoxicology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cavaco produzido a partir de madeira não tratada	28
Figura 2 - Queima de madeira tratada disposta em suporte cerâmico.....	29
Figura 3 - Armazenamento de cinzas de madeira não tratada.....	30
Figura 4 - Resultados da avaliação toxicológica das soluções extratoras em modelo animal de <i>Artemia sp.</i>	31
Figura 5 - Percentual de redução dos metais Cr, Cu e As em madeira tratada com CCA após 24h de extração com diferentes soluções extratoras.....	32
Figura 6 - Fluxograma do ensaio de citotoxicidade com MTT	37
Figura 7 - Fluxograma das etapas do ensaio cometa	39
Figura 8 - Classes de danos obtidas pelo Teste Cometa.....	40
Figura 9 - Resultados da viabilidade das bactéria <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> (ambas 1×10^8 UFC/mL) de exposição a LCPMT-CCA e LCPMNT	46
Figura 10 - Bactérias <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> 1×10^8 UFC expostas aos lixiviados brutos [100%].....	47
Figura 11 - Resultados dos efeitos tóxicos dos dois lixiviados LCPMNT e LCPMT-CCA em bulbos de <i>A. cepa</i> expostos a diferentes concentrações (25–100%).....	49
Figura 12 - Germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> e crescimento radicular após exposição de dois lixiviados LCPMNT e LCPMT-CCA a diferentes concentrações (25–100%).....	50
Figura 13 - Resultados de efeitos dos lixiviados LCPMNT e LCPMT-CCA sobre indivíduos de <i>Artemia spp.</i>	54
Figura 14 - Citotoxicidade <i>in vitro</i> de lixiviados LCPMNT e LCPMT- CCA nas células NIH3T3.....	56
Figura 15 - Efeitos dos lixiviados LCPMNT e LCPMT-CCA na frequência e no índice de danos ao DNA de células NIH3T3.....	57
Figura 16 - Ensaio de hemólise em eritrócitos humanos incubados por 2h com lixiviados LCPMNT (A) e LCPMT-CCA (B) em diferentes concentrações.....	60
Figura 17 - Avaliação de hemólise dos eritrócitos humanos incubados por 2h com lixiviados LCPMNT por citometria de fluxo.....	62
Figura 18 - Avaliação de hemólise dos eritrócitos humanos incubados por 2h com lixiviados LCPMT-CCA por citometria de fluxo.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549	Linhagem de células pulmonares humanas
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AWPA	do inglês, <i>American Wood Protection Association</i>
CAT	Catalase
CCA	Arseniato de Cobre Cromatado
CLSI	do inglês, <i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
DMEM	do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	do inglês, Ethylenediamine tetraacetic acid
EPA	do inglês, <i>States Environmental Protection Agency</i>
FPG	do inglês, <i>formamidopyrimidine DNA glycosylase</i>
FSC	do inglês, <i>Forward Scatter</i> (dispersão direta)
GPx	Glutathione Peroxidase
ICP-OES	Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado
LCPMNT	Lixiviado de cinzas pesadas de madeira não tratada
LCPMT-CCA	Lixiviado de cinzas pesadas de madeira tratada com CCA
MDA	Malondialdeído
MTT	do inglês, [(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan]
NHI3T3	Linhagem de células de fibroblastos murinos
PCA	do inglês, <i>Plate Count Agar</i>
SB	do inglês, <i>strand breaks</i>
SOD	Superóxido dismutase
SSC	do inglês, <i>Side Scatter</i> (dispersão lateral)
UFC	Unidades formadoras de colônias
WTE	do inglês, <i>Waste-to-energy</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	A INDÚSTRIA DA MADEIRA.....	13
1.1.1	Madeira como material de construção civil.....	13
1.1.2	Madeira como recurso energético	14
1.1.3	Tratamento de madeira com arseniato de cobre cromatado	16
1.2	TOXICOLOGIA	17
1.2.1	Agente tóxico ou toxicante	18
1.2.2	Toxicocinética.....	20
1.2.3	Toxicodinâmica.....	20
1.2.4	Ecotoxicologia ou toxicologia ambiental	21
1.2.5	Genotoxicologia e mutagênese	22
1.3	TOXICOLOGIA DA MADEIRA TRATADA COM CCA	22
1.3.1	Cinzas oriundas de madeira tratada com CCA	24
1.3.2	Lixiviação	26
2	OBJETIVOS	27
2.1	OBJETIVO GERAL	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	28
3.1.1	Obtenção das amostras de madeira tratada e não tratada e produção das cinzas.	28
3.1.2	Produção do lixiviado de cinzas de madeira tratada e não tratada em diferentes proporções	30
3.2	TESTES FÍSICO-QUÍMICOS.....	33
3.2.1	Análises de metais	33
3.2.2	Análise de fenóis	33
3.3	TESTES TOXICOLÓGICOS.....	34
3.3.1	Testes com microrganismos	34
3.3.2	Testes com modelos vegetais	34
3.3.3	Testes com modelos animais	35

3.3.4	Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i>	36
3.4	TESTES GENOTOXICOLÓGICOS	37
3.4.1	Ensaio cometa	37
3.5	ENSAIO DE HEMÓLISE <i>EX VIVO</i>	40
3.5.1	Ensaio de hemólise <i>ex vivo</i> por citometria de fluxo	41
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	TESTES FÍSICO-QUÍMICOS	43
4.2	TESTES TOXICOLÓGICOS	45
4.2.1	Testes com microrganismos	45
4.2.2	Testes com modelos vegetais	48
4.2.3	Testes com modelos animais	53
4.2.4	Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i>	55
4.3	TESTES GENOTOXICOLÓGICOS	56
4.3.1	Ensaio cometa	56
4.4	ENSAIO DE HEMÓLISE <i>EX VIVO</i>	60
5	CONCLUSÃO	65
6	PERSPECTIVAS	67
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 A INDÚSTRIA DA MADEIRA

A indústria da madeira envolve a produção e a colheita de árvores para diversos fins, como a construção civil, a construção naval e a fabricação de móveis. Esta indústria inclui processos de conversão da madeira em produtos de madeira serrada, em papel e celulose, produtos químicos, ou lenha, tendo o seu processo produtivo as etapas de extração, armazenamento, tratamento químico e destinação para uso (SINDIMADE, 2018).

No período de 2004 a 2012, no Brasil, a área de floresta plantada teve crescimento de 50,4%. A demanda de celulose e papel, seguida pelo setor de painéis à base de madeira, foram os principais impulsores deste crescimento. Mas também foi notável o desenvolvimento de novas florestas plantadas no Brasil para fins energéticos. As espécies do gênero *Eucalyptus*, por apresentarem excelente adaptabilidade às condições edafoclimáticas do país, são as mais aplicadas e pesquisadas. A produtividade média atual do eucalipto é de 40,7 m³/ha·ano (COLODETTE et al., 2014).

A Pesquisa Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura traz os dados de produção de madeira no Brasil, no período de 2011 a 2016, dos quais a produção de lenha e madeira em toras reduziu nos últimos anos, de lenha 37.574.207 m³ e 14.116.711 m³ de madeira em tora, produzidos em 2011, para 24.954.940 m³ e 11.450.693 m³, respectivamente, em 2016 (IBGE, 2016). Essa redução também foi constatada na Europa e se atribui à crise financeira que teve seu início em 2007 (HILDEBRANDT; HAGEMANN; THRÄN, 2017).

Apesar da redução na produção de madeira, o volume total produzido em 2016 no Brasil é ainda significativo, cerca de 36.405.633 m³ somando-se o volume de madeira em toras e lenha (IBGE, 2016).

1.1.1 Madeira como material de construção civil

A madeira é um insumo da construção civil de longa data. A madeira de eucalipto foi muito utilizada em construções de edificações no século XIX, tornando-se representante da construção deste século. Isso se deve às características

mecânicas desta madeira, na qual a madeira de eucalipto tem um comportamento praticamente linear entre 0,4 MPa e 30 MPa, em teste de resistência à tração, e para resistência à ruptura, esta madeira possui valor médio de 65,5 MPa. Já em teste de resistência à compressão, possui um valor médio de força de compressão paralela às fibras de 59,1 MPa (RAPOSO et al., 2017).

A construção avaliada por Raposo et al. (2017), datada do século XIX, localizada em Felgueiras, Portugal, é um edifício composto por dois pisos e o telhado, e possui paredes em alvenaria, mas grande parte de sua estrutura se aplica à madeira de eucalipto.

O setor de construção europeu utiliza de forma significativa os materiais de construção à base de madeira. Entre 1950 e 1960, foram consumidas em torno de 5,2 milhões de toneladas de madeira para construção, e, entre 1990 e 2010, este número foi de 6,4 milhões de toneladas, evidenciando significativo aumento do uso da madeira na construção civil, principalmente em países da Europa Ocidental, como Reino Unido, Áustria, Itália e Alemanha. Todavia, com a crise financeira de 2007, houve uma queda em relação ao número de licenças para novos edifícios, cerca de 10% de 2010 a 2015 (HILDEBRANDT; HAGEMANN; THRÄN, 2017).

Assim como na Europa, no Brasil, o setor de construção utiliza a madeira em grande escala. Estes setores se destacam no cenário socioeconômico, com contribuições significativas ao PIB (CAPANEMA et al., 2013).

1.1.2 Madeira como recurso energético

A intensificação das atividades antrópicas, acompanhada do crescimento populacional exponencial e ao grande aumento no consumo pessoal, gerou aumento significativo na demanda global por energia, que triplicou nos últimos 50 anos e pode triplicar nos próximos 30 anos (GOLDEMBERG, 2001; HINRICHS; KLEINBACH; REIS, 2015).

Esta grande demanda é proveniente dos mercados de energia insensíveis às dimensões socioambientais. Este posicionamento do mercado culminou nas atuais mudanças climáticas que desencadearam uma crise, na qual as questões inerentes ao ecológico irão atuar com uma força cada vez maior. Nesse sentido, a utilização de fontes renováveis e mais limpas para produção de energia tem sido alternativa mais investida (SACHS, 2007).

Neste contexto, de acordo com Brito (2007), a utilização da madeira como recurso energético reduz a dependência energética do mercado externo, além de oferecer garantia quanto ao suprimento da demanda, por ser considerada recurso energético renovável. A madeira utilizada como recurso energético, denominada como lenha, tem contribuição histórica para o desenvolvimento da humanidade. Esta foi inicialmente empregada para aquecimento e cocção de alimentos e atualmente é aproveitada como combustível em processos de geração de energia térmica, mecânica e elétrica. No Brasil, 69% da madeira utilizada é para fins energéticos: produção de carvão vegetal, consumos residenciais, industrial e agropecuário (BRITO, 2007).

O principal consumidor de madeira de florestas naturais é o setor de energia. Em 2011, a produção de carvão vegetal foi de 4.951.207 toneladas, das quais 69,5% foram produzidas em florestas plantadas e 30,4% em florestas naturais. A maior participação relativa de madeiras originárias de florestas naturais está na produção de lenha para uso industrial, que utiliza 43,8% das florestas nativas comercialmente exploradas (COLODETTE et al., 2014).

A lenha constitui uma fonte de energia provida pela natureza na sua forma direta, energia primária, e por muito tempo era a única fonte de energia disponível para cozinhar, para aquecimento e para proteção (GIODA, 2019). Esta é utilizada em algumas áreas, como para uso na cocção de alimentos, em indústrias químicas, alimentícias, têxtil, papel e celulose, cerâmica, cimento e para o setor agropecuário, na secagem de grãos e aquecimento de animais. Além disso, esta energia primária é transformada em usinas termoelétricas, onde é convertida em fontes de energia secundária (FONTES, 2005).

A lenha tem desempenhado um papel importante na matriz energética brasileira desde os tempos coloniais, quando era usada em caldeiras e fogões (GIODA, 2019). Estima-se crescimento do fornecimento de energia elétrica, entre 2017 e 2030, a partir de lenha e carvão vegetal, de 1% em 2017 para 6% em 2030 (MARTINEZ et al., 2019).

Entretanto, poucos estudos foram desenvolvidos no Brasil a respeito da emissão de gases e partículas relacionados ao uso de lenha, fogões e outros métodos de cozimento, acarretando numa compreensão dos efeitos sobre a saúde da população e o meio ambiente pouco elucidada. Além disso, o uso da madeira como recurso energético no país varia de acordo com diferenças climáticas,

socioeconômicas e culturais. Os poucos estudos encontrados na literatura mostram a prevalência de sintomas respiratórios e a incidência de câncer relacionados à queima de biomassa. Estudos sobre emissões da lenha, sobre os recursos energéticos de madeira e seus impactos ambientais são escassos (GIODA, 2019).

Apesar de a madeira ter característica de fonte energética renovável, sua utilização na forma de lenha apresenta ônus ambientais e à saúde. Quando a madeira não é submetida à combustão completa, o que acontece no uso doméstico, principalmente em países em desenvolvimento, geram produtos de combustão incompleta – principalmente monóxido de carbono, mas também benzeno, butadieno, formaldeído, hidrocarbonetos poliaromáticos e muitos outros compostos que representam riscos para saúde e são poluentes atmosféricos (GIODA, 2019; SMITH, 2006).

O risco é maior quando a madeira com tratamentos preservativos, como as tratadas com arseniato de cobre cromatado (CCA), são submetidas à combustão, porque há emissões atmosféricas de compostos tóxicos voláteis e cinzas (WASSON et al., 2005).

1.1.3 Tratamento de madeira com arseniato de cobre cromatado

A formulação arseniato de cobre cromatado (CCA) é um tradicional tratamento preservativo de madeira, muito utilizado nos EUA, popularizado a partir da década de 1970. Sua composição inclui aproximadamente 20% de cobre (CuO), de 35 a 60% de cromo na forma de peróxido de cromo (CrO₅) e de 15 a 45% de arsênio (As₂O₅) (SHIAU; SMITH; AVELLAR, 2000).

A madeira tratada com CCA é classificada pela *American Wood Protection Association* - AWP (1991) de acordo com as proporções dos seus componentes, Cr, Cu e As, em três tipos: tipo A, B e C. A composição do tipo A é de 65,5% de cromo (CrO₅), 18,1% de cobre (CuO) e 16,4% de arsênio (As₂O₅); para o tipo B, é de 35,3% de cromo (CrO₅), 19,6% de cobre (CuO) e 45,1% de arsênio (As₂O₅); e para o tipo C, é de 47,5% de cromo (CrO₅), 18,5% de cobre (CuO) e 34,0% de arsênio (As₂O₅) (AWPA, 1991).

De acordo com *Arch Wood Protection* (2004), o tratamento à base de CCA proporciona à madeira características de resistência contra a ação de micro-organismos, cupins e fungos, mantendo a madeira limpa, inodora, sem manchas, e,

consequentemente, essas características fornecem uma madeira de maior durabilidade.

Entretanto, essa formulação largamente utilizada nos EUA desde a década de 1940, e extremamente popularizada neste mesmo país em 1970 (cerca de 140 milhões de metros cúbicos em uso no ano de 2000), revela um elevado potencial tóxico (SHIAU; SMITH; AVELLAR, 2000).

Mesmo após as restrições sancionadas pela *States Environmental Protection Agency* (EPA) em 2003 para o uso residencial, Jambeck et al. (2007) estimaram para o ano de 2008 que cerca de 9,7 milhões de m³ de madeira tratada com CCA foram descartadas nos EUA. Além disso, com base nestas estimativas, extrapolaram que o volume de madeira tratada entre 2000 e 2030 variaria entre 6 e 10 milhões de m³ por ano nos EUA.

Na década de 1960, no Brasil, alinhada à tendência do mercado internacional, a produção de madeiras tratadas ganhou maior ênfase e, no final desta década, em 1969, foi criada a Associação Brasileira dos Preservadores de Madeira (ABPM) em São Paulo. Nas décadas seguintes, o número de usinas de tratamento de madeira no Brasil teve crescimento significativo: em 1982, tinham 13 usinas, e, entre 1995 e 1996, já tinham registradas 68 usinas com capacidade de produção anual estimada em 865 mil m³ de madeira tratada (VIDAL et al., 2015).

1.2 TOXICOLOGIA

A utilização de substâncias como drogas e fármacos ao longo da história da humanidade foi comum em função de seus efeitos, porém, somente no período pós-Segunda Guerra Mundial, os efeitos benéficos potenciais de fármacos foram melhor elucidados. Além disso, as possibilidades das suas reações adversas também começaram a ser descritas (PASSAGLI, 2013).

A toxicologia, de acordo com Oga e Siqueira (2003), é a ciência que estuda os efeitos nocivos da interação de substâncias químicas com organismos biológicos. Para Gupta (2018), a toxicologia é a ciência dos venenos, ou seja, é o entendimento de como vários agentes causam prejuízos à saúde humana e a outros organismos. Passagli (2013) evidencia que a toxicologia se encarrega de elucidar os mecanismos das lesões tóxicas e promover a avaliação quantitativa de alterações fisiológicas produzidas a partir da exposição a substâncias químicas. Portanto,

toxicologia é o estudo dos efeitos adversos de agentes físicos ou químicos sobre os organismos vivos (GUPTA, 2018).

A toxicologia é desenvolvida por pesquisadores com diferentes formações técnicas e profissionais, permitindo o aperfeiçoamento dos conhecimentos a partir de contribuições específicas de cada área que se envolve com a toxicologia (GOES, 1998). Esta ciência inclui a avaliação dos efeitos pelos quais os toxicantes desenvolvem o potencial toxicológico. Esses efeitos podem se manifestar por meio de diferentes mecanismos, como teratogenicidade, carcinogênese, mutagênese, imunotoxicidade, neurotoxicidade, distúrbios endócrinos, entre outros, os quais podem levar a alterações sutis após a exposição ao agente tóxico ou até mesmo à morte imediata do organismo exposto (GUPTA, 2018).

Esta ciência é organizada em algumas áreas de atuação, conforme a natureza do agente toxicante ou de como este alcança o organismo. Dentre elas, pode-se citar a toxicologia ambiental, área que estuda as ações e os efeitos nocivos causados por contaminantes químicos resultantes da poluição do ambiente com os organismos humanos (OGA; ZANINI, 2003).

Além disso, existe uma interface entre os estudos da toxicologia e da genética, que se aplica tanto à toxicologia clínica, quanto à toxicologia ambiental e à ecotoxicologia. Esta interface é conhecida por genotoxicidade, que estuda os processos que alteram o DNA, podendo ser alterações físico-químicas na sua estrutura, mutagênese, e alterações no determinismo genético ao nível celular ou orgânico, carcinogênese e teratogênese, respectivamente (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

1.2.1 Agente tóxico ou toxicante

Entende-se por agente tóxico qualquer substância química que interage com um organismo e é capaz de gerar danos ao seu sistema biológico, ou contém potencial intrínseco para este fim, de forma a produzir um efeito tóxico, como danos, lesões, alterar funções ou levar o organismo ao óbito (PASSAGLI, 2013). A propriedade inerente ao agente tóxico de causar estes danos ao organismo, por meio de alterações físico-químicas, em condições padronizadas, é definida como toxicidade, que é a mensuração do potencial tóxico de uma substância. Já ação

tóxica é a forma pela qual o agente tóxico exerce sua atividade sobre as estruturas teciduais do organismo (OGA; SIQUEIRA, 2003).

A ação tóxica pode ser modulada por muitos fatores, como vias de penetração no organismo, dose, duração da exposição, composição química do toxicante e interação deste com outras substâncias químicas. Os agentes tóxicos são categorizados pela sua ação tóxica, ou seja, pelo órgão ou sistema de atuação e de seus efeitos decorrentes desta interação, como neurotóxicos, os quais atingem o cérebro e o sistema nervoso, ou hepatotóxicos, os quais atingem o fígado (GOES, 1998).

Existem diferentes tipos de agentes tóxicos, desde substâncias produzidas naturalmente, como as biotoxinas e venenos, até tóxicos poluentes (GUPTA, 2018). Os tóxicos podem ser classificados por suas características físicas como gases, vapores e partículas (sólidos). Também são classificados quanto às suas características químicas, pela estrutura química (PASSAGLI, 2013).

Os tóxicos poluentes são qualquer substância indesejável resultante da descarga ou mistura de materiais nocivos de origem antrópica que contaminam o ambiente e contribuem para a poluição (GUPTA, 2018). No caso do objeto de estudo deste trabalho, o lixiviado formado a partir das cinzas de madeira tratada com CCA é classificado como um tóxico poluente, uma vez que este é resultado da geração de efluentes de processos antrópicos.

O agente tóxico é uma substância exógena, ou seja, uma substância química estranha ao organismo. Como exemplo, podemos citar os agentes poluentes da atmosfera e alguns metais como mercúrio e chumbo. Esses agentes podem ser definidos como xenobióticos, desde que não tenham papel fisiológico conhecido (OGA; SIQUEIRA, 2003).

Oga, Siqueira (2003) e Passagli (2013) afirmam que a intoxicação é caracterizada pelo processo patológico, sinais e sintomas, desencadeado pelo agente tóxico. Estes provocam um desequilíbrio orgânico fisiológico consequente de alterações bioquímicas no organismo alvo, que ocorreram em dose e tempos suficientes para romper a homeostase do organismo.

Além disso, os riscos inerentes à intoxicação estão relacionados à crescente produção de diversas substâncias químicas. Atualmente existem mais de 11 milhões dessas substâncias no mundo e aproximadamente 80 mil são de uso comum (RUPPENTHAL, 2013).

1.2.2 Toxicocinética

De acordo com Passagli (2013), a toxicocinética se refere a uma fase na qual o organismo tem ação sobre o agente, tóxico a fim de diminuir ou evitar a ação nociva da substância sobre ele. A toxicocinética permite avaliar matematicamente os movimentos do agente tóxico no organismo a partir do estudo da relação entre a quantidade deste que atua no organismo e sua concentração no plasma, relacionando os processos de absorção, distribuição e excreção (OGA, 2003). Diz respeito à trajetória do agente tóxico, desde a penetração no organismo até sua eliminação, envolvendo os processos de absorção, distribuição, acumulação, metabolismo ou biotransformação e excreção (GOES, 1998; AZEVEDO; LIMA, 2003; GUPTA, 2016).

As vias de introdução do tóxico no organismo são as precursoras do processo de absorção. Os agentes tóxicos são distribuídos no organismo principalmente pela corrente sanguínea para os diversos tecidos do organismo. A distribuição para cada tipo de tecido dependerá de diversas condições, como o fluxo sanguíneo e linfático, capacidade química de o agente tóxico atravessar membranas celulares e interações bioquímicas (GOES, 1998; AZEVEDO; LIMA, 2003; (OGA; ZANINI, 2003).

O mecanismo da biotransformação tem por finalidade a eliminação do tóxico do organismo. O tóxico é alterado quimicamente, geralmente por processos enzimáticos, em metabólitos que são quase sempre menos tóxicos, mais polares e hidrossolúveis, facilitando a posterior excreção renal do agente tóxico. A excreção é o processo pelo qual o agente tóxico é eliminado do organismo, e ocorre por meio de diferentes vias, como a renal, fecal, respiratória, cutâneo-mucosa, entre outras (AZEVEDO; LIMA, 2003; OGA; ZANINI, 2003).

1.2.3 Toxicodinâmica

A toxicodinâmica relaciona-se ao potencial de ação do agente tóxico no órgão-alvo. Os fenômenos da toxicocinética determinam a biodisponibilidade do toxicante, ou seja, a concentração do agente tóxico no sítio de ação que subsidiará a promoção do efeito tóxico. Sendo assim, a toxicodinâmica determina a quantidade

disponível do toxicante no sítio de ação em condições efetivas de provocar os efeitos tóxicos (dose efetiva) (PAOLIELLO; SILVA, 2003).

A fase da toxicodinâmica é caracterizada pela presença da substância química ou seus metabólitos em sítios específicos do órgão alvo. Essas substâncias, ao interagirem com as moléculas constituintes das células, promovem alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais que culminam no processo de intoxicação (RUPPENTHAL, 2013).

As manifestações da intoxicação podem ser categorizadas quanto à intensidade dos seus efeitos (leves, moderadas e graves), quanto à duração da exposição (agudas, subagudas e crônicas) e quanto ao tipo (locais e sistêmicas) (GOES, 1998).

As interações que caracterizam a etapa toxicodinâmica podem ser classificadas em diferentes categorias. As de efeito aditivo, são aquelas cujo efeito final induzido é a soma dos efeitos isolados. O efeito sinérgico se dá quando o efeito final é maior do que a soma dos efeitos isolados. Já a potenciação ocorre onde o resultado final é aumentado pela interação com outro tóxico. Por fim, o antagonismo se dá quando o efeito de um composto é inativado, eliminado ou diminuído quando combinado a outros (PAOLIELLO; SILVA, 2003; RUPPENTHAL, 2013).

1.2.4 Ecotoxicologia ou toxicologia ambiental

Admitindo-se que um dos objetivos da Toxicologia enquanto ciência é prevenir os riscos decorrentes do contato a diferentes agentes tóxicos e a intoxicação consequente deste, a ecotoxicologia, neste sentido, tem por base a prevenção destes riscos decorrentes de contaminação ambiental por uma infinidade de substâncias químicas que estão sendo relacionadas à morbidade e mortalidade por doenças, como câncer (FERNICOLA; BOHRER-MOREL; BAINY, 2003; PEDROZO, 2003).

Neste contexto, estudos com organismos sentinelas devem ser delineados na definição de um valor-limite para garantia da saúde da população exposta, neste caso, não somente populações humanas, mas todo o sistema biológico e ecológico de um determinado ambiente. Os organismos sentinelas são intensamente mais expostos e muitas vezes mais sensíveis do que os humanos. Desta forma, eles podem ser úteis para explicar o modo de ação, ou seja, a

toxicocinética e toxicodinâmica de um determinado toxicante que não foi identificado em humanos (PEDROZO, 2003).

1.2.5 Genotoxicologia e mutagênese

A genotoxicidade trata do estudo da toxicologia sob o aspecto genético, evidenciando as perturbações da vida ou a indução à morte ao nível das células e do organismo. Sendo assim, trata dos processos que alteram a base genética da vida, o ácido desoxirribonucleico – DNA. Estas alterações, quando ocorrem na estrutura físico-química, desencadeiam os processos de mutagênese. Já os processos de carcinogênese e teratogênese são alterações no determinismo genético ao nível celular ou orgânico, respectivamente (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

Os processos de alterações do DNA, como a mutagênese, a carcinogênese e a teratogênese, são interações toxicodinâmicas especiais, uma vez que envolvem fatores de interações complexas, tanto exógenos quanto endógenos (PAOLIELLO; SILVA, 2003).

Um agente que tem ação alquilante pode atingir o DNA e desencadear mutações devido a modificações na estrutura molecular, alterando a sequência das bases do DNA, caracterizando a mutagênese. Este agente pode ser químico ou formas de radiação, como a luz ultravioleta e raios x, que causam alterações irreversíveis e hereditárias no material genético da célula. Já o fruto de mutações somáticas em outras células do organismo pode desenvolver tumores, que por sua vez caracterizam a carcinogênese. Após acumular mutações por meio de vários processos de divisões, uma célula poderá perder o controle de sua divisão, desta forma podendo acarretar no surgimento de câncer (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003; RUPPENTHAL, 2013).

1.3 TOXICOLOGIA DA MADEIRA TRATADA COM CCA

O tratamento preservativo CCA fornece altos níveis de concentração de arsênico e cromo na madeira tratada, e devido ao potencial contato humano em ambientes ocupacionais e à exposição ecológica, questões quanto aos efeitos nocivos à saúde pública começaram a ser levantadas. Devido aos possíveis efeitos

nocivos da madeira tratada com CCA, esta foi largamente retirada da maioria das aplicações residenciais, entretanto, pela sua durabilidade e resistência à lixiviação, a madeira tratada com CCA permanecerá em estruturas previamente construídas (MATOS et al., 2009).

Neste sentido, a *United States Environmental Protection Agency* (EPA) restringiu o uso de madeira tratada com CCA para usos residenciais em 2003 nos EUA como medida preventiva mediante a potencialidade de efeitos tóxicos à saúde humana e ao meio ambiente (VIDAL et al., 2015).

Além disso, no Japão, de acordo com Ohgami et al. (2015), cessou-se a produção de madeira tratada com CCA nos últimos vinte anos, após a constatação deste mesmo potencial tóxico. Outros países como Suécia, Alemanha e Austrália também definiram restrições ao uso de CCA como método preservativo de madeira, principalmente pela presença do arsênio e do grau de lixiviação e descarte da madeira tratada (VIDAL et al., 2015).

De acordo com Matos et al. (2009), poucos estudos foram realizados acerca dos efeitos do tratamento CCA à saúde. Conforme os mesmos autores, não há estudos de toxicidade envolvendo a administração de CCA em modelos animais. Dos estudos realizados, sabe-se que CCA é corrosivo à pele, olhos e trato digestivo. Além disso, pessoas que foram expostas ao CCA líquido ou às cinzas contaminadas com altos níveis de cromo (IV), arsênico e cobre, desenvolveram graves efeitos à saúde caracterizados por hemorragias nasais e no sistema digestivo, urina escura, efeitos sobre o sistema nervoso, como formigamento e dormência nas mãos e pés, confusão mental, além de erupções cutâneas e descamação da pele. Para esclarecer o risco potencial de madeira tratada com CCA como produto de construção, os autores avaliaram a nefrotoxicidade do CCA e seus constituintes utilizando modelo animal de camundongos (MATOS et al., 2009).

Uma alternativa que também possibilita avaliar os potenciais efeitos toxicológicos do tratamento preservativo CCA são os testes *in vitro*. Ohgami et al. (2015) avaliou detritos de madeira coletados após o tsunami em 2011 no Japão, verificando os efeitos da co-exposição a Cr, Cu e As em atividades celulares, nas linhagens BEAS-2B e A549. Esta pesquisa demonstrou o risco para a saúde da co-exposição aos elementos Cr, Cu e As, embora as concentrações utilizadas *in vitro* não fossem baseadas nas concentrações reais no ar através da incineração de detritos na área de estudo. Além disso, os resultados obtidos neste estudo indicam

que apenas 2,1% dos detritos eram oriundos de madeiras tratadas com CCA e, no entanto, estas contribuíram para o aumento das concentrações de Cr, Cu e As em 110 vezes, 35 vezes e 300 vezes, respectivamente, em madeiras não tratadas, que representavam 95,3% do total de detrito avaliado (OHGAMI et al., 2015).

1.3.1 Cinzas oriundas de madeira tratada com CCA

A utilização de madeira como combustível é uma prática comum, que apresenta, entre outras vantagens, a produção de cinzas com propriedades interessantes para aplicação na agricultura. Porém, apesar de a madeira tratada ter uso proibido como lenha, esta acaba sendo utilizada para tal finalidade. Desta forma, a qualidade das cinzas produzidas a partir de misturas de madeiras tratadas e não tratadas é comprometida pela presença de concentrações de cromo, cobre e arsênio, provenientes da formulação do tratamento da madeira (SOLO-GABRIELE et al., 2002).

A combustão como destinação final de resíduos sólidos, que contêm madeira tratada com CCA, para fins de produção de energia (WTE, do inglês *waste-to-energy*), possui algumas vantagens que são ressaltadas por Jambeck et al (2007). As vantagens atribuem-se à diminuição de área do aterro e consequente produção de energia. Entretanto, a concentração de arsênico e cromo no lixiviado das cinzas é maior quando comparado ao lixiviado proveniente de resíduos sólidos urbanos que contêm madeira tratada com CCA, o que pode aumentar os custos de gerenciamento para a destinação final de madeira WTE, necessitando avaliar em longo prazo os níveis de poluição atmosférica e da lixiviação proveniente da cinza disposta (JAMBECK et al., 2007).

Quando a madeira tratada com CCA é submetida à combustão, há liberação de químicos tóxicos por meio de emissões atmosféricas e cinzas. Tanto as cinzas volantes como as cinzas residuais, aquelas que precipitam nos fundos dos fornos, geradas durante a combustão de madeiras tratadas com CCA, podem conter quantidades significantes de arsênio. A exposição a níveis agudos a este metal pode levar à morte, assim como a exposição crônica ao câncer. Além disso, as cinzas resultantes da combustão de madeira tratadas com CCA concentram muito o cromo, o qual muitas vezes é oxidado para Cr (VI), tornando-o mais tóxico e com maior mobilidade (WASSON et al., 2005; JAMBECK et al., 2007).

Ambas as formas de disposição final de madeira tratada com CCA, combustão para fins energéticos ou aterramento, apresentam potenciais riscos toxicológicos devido ao produto final destes, lixiviados de cinzas ou lixiviados de resíduos sólidos, que contêm concentrações e especiações químicas dos componentes do tratamento, arsênio, cromo e cobre, potencialmente tóxicas à saúde humana e ecotóxicas.

Na avaliação geral de seus resultados, Ohgami et al. (2015) sugerem que se deve evitar a emissão para a atmosfera, principalmente de Cr e As, por meio da incineração de restos de madeira, incluindo madeira tratada com CCA, provenientes do tsunami de 2011, uma vez que os resultados deste estudo evidenciam aumento do risco carcinogênico pela coexposição ao Cr e As ao processo de incineração de detritos, incluindo madeira tratada com CCA após o desastre (OHGAMI et al., 2015).

Neste contexto, Danielsen et al. (2009) concluíram em seu estudo que o material particulado da queima da madeira, neste caso sem tratamento preservativo, gera danos ao DNA, tanto em termos de danos SB (fragmentação das fitas da molécula de DNA), quanto em danos oxidativos avaliados por FPG em linhagens celulares pulmonares humanas A549. Embora seja necessário mais estudo para extrapolação em humanos, estes resultados indicam que os materiais particulados podem induzir efeitos adversos à saúde.

Para a mesma linhagem celular A549, os ensaios realizados pelos autores supracitados mostraram que tanto cinzas de madeira sem tratamento preservativo quanto cinzas de madeira tratada com CCA apresentaram risco carcinogênico (DANIELSEN et al., 2009; OHGAMI et al., 2015). Desta forma, o risco de cinzas provenientes de madeiras tratadas com CCA é potencializado pela presença dos componentes tóxicos cromo (IV), arsênico e cobre, associado ao risco inerente à própria cinza de madeira (WASSON et al., 2005).

A avaliação dos efeitos ecotoxicológicos envolvem uma crescente preocupação em relação ao destino final das cinzas e aos riscos ambientais inerentes a estas. As cinzas com potencial efeito ecotoxicológico são classificadas pela União Europeia com base em seus riscos imediatos ou retardados ao ambiente, porém não existem critérios quantitativos padronizados para este fim, mas sim um consenso a respeito da caracterização ecotoxicológica por meio de testes com sistemas biológicos (STIERNSTRÖM et al., 2011).

1.3.2 Lixiviação

A lixiviação é definida como o processo de dissolução pelo qual um sólido entra em contato com um líquido (lixivante), após o qual o transporte de massa ocorre entre essas duas fases. Desta forma, a lixiviação pode ocorrer a partir da madeira e dos resíduos da incineração (cinzas) (LUO et al., 2019).

O lixiviado formado a partir das cinzas de madeira tratada com arseniato de cobre cromatado (CCA) pode ser classificado como um tóxico poluente, uma vez que este é resultado da geração de efluentes de processos antrópicos (JAMBECK et al., 2007; GUPTA, 2018).

Para avaliar os efeitos toxicológicos de lixiviados de cinzas energéticas, Stiernström et al. (2011) propõem a utilização de uma bateria de testes ecotoxicológicos que mimetizam uma cadeia alimentar por meio da aplicação de diferentes organismos biológicos como bioindicadores.

A dificuldade em determinar totalmente a contribuição tóxica de cada elemento com base em sua presença na matriz faz dos testes ecotoxicológicos uma ferramenta importante para avaliar os efeitos perigosos de uma matriz complexa, como o eluato de cinzas (STIERNSTRÖM et al., 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar os efeitos genotóxicos, ecotóxicos e tóxicos de lixiviados de cinzas provenientes da combustão de madeira tratada com arseniato de cobre cromatado tipo C e de madeira não tratada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Produzir lixiviados a partir das cinzas pesadas provenientes da combustão de madeira tratada e não tratada e quantificar o teor de metais e metaloide nas cinzas e seus lixiviados.
- II. Verificar efeito em microrganismos, bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, dos lixiviados das cinzas pesadas.
- III. Avaliar fitotoxicidade em testes subagudo de *Allium cepa* e agudo de *Lactuca sativa* expostas aos lixiviados das cinzas pesadas.
- IV. Verificar a toxicidade aguda em microcrustáceos *Artemia spp.* dos lixiviados das cinzas pesadas provenientes da combustão de madeira tratada e não tratada.
- V. Avaliar citotoxicidade em células de fibroblastos da linhagem NIH3T3 dos lixiviados das cinzas pesadas utilizando-se ensaio de MTT.
- VI. Avaliar os efeitos genotóxicos dos lixiviados utilizando-se teste cometa em células de fibroblastos linhagem NIH3T3.
- VII. Avaliar o potencial hemolítico *ex vivo* dos lixiviados em eritrócitos humanos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de madeira tratadas com CCA tipo C e de madeiras não tratadas foram obtidas comercialmente em usina de tratamento localizada no Estado de Santa Catarina, no município de Criciúma.

3.1.1 Obtenção das amostras de madeira tratada e não tratada e produção das cinzas.

As amostras de madeira obtidas comercialmente foram identificadas em dois grupos, tratadas e não tratadas. Após, foram submetidas a processo de cominuição para produção de cavaco, como ilustra a Figura 1, a fim de obter-se a queima completa e mais eficiente da madeira (SOLO-GABRIELE et al., 2002).

Figura 1 - Cavaco produzido a partir de madeira não tratada



Fonte: Da autora, 2019.

O ensaio de queima foi realizado conforme Solo-Gabriele et al., (2002) com adaptações. A produção de cinzas foi realizada por queima, Figura 2, em lotes de 0,5 kg de cavaco de madeira tratada e não tratada, submetidos às mesmas condições, em dias distintos. Dispostos em peça cerâmica com resistência a altas temperaturas, a incineração ocorreu em temperatura entre 560 a 660°C. A temperatura da chama foi mensurada durante todo o processo de queima, mantendo uma média em 612°C. Realizou-se um teste-piloto, a fim de definir o tempo de

queima suficiente para a transformação completa do lote de cavaco em cinzas, mensurando-se o rendimento do ensaio. O processo foi cronometrado, obtendo-se uma duração média de 1 hora e 30 minutos. A queima foi realizada de forma que as cinzas voláteis foram liberadas e as cinzas de fundo (cinzas pesadas) resultantes foram coletadas, mensurou-se a massa para posterior produção de lixiviado.

Figura 2 - Queima de madeira tratada disposta em suporte cerâmico



Fonte: Da autora, 2018.

O rendimento médio de produção de cinzas pesadas para madeira tratada foi de 1,06%, e para madeira não tratada foi de 1,16%. As cinzas foram armazenadas em sacos plásticos vedados, devidamente identificados, como ilustra a Figura 3, para posterior realização dos ensaios de lixiviação.

Figura 3 - Armazenamento de cinzas de madeira não tratada



Fonte: Da autora, 2018.

3.1.2 Produção do lixiviado de cinzas de madeira tratada e não tratada em diferentes proporções

3.1.2.1 Determinação das soluções extratoras

Foram realizadas determinações preliminares nas amostras de cinzas, realizando-se o teste da mensuração de pH para determinação da solução extratora para os ensaios de lixiviação. Uma porção de 0,5 g foi transferida para um béquer, e foi adicionado 9,65 mL de água ultrapura, deixou-se em agitação magnética vigorosa por 5 min. Após, foi mensurado o pH.

Com este resultado, foi definida a solução extratora mais adequada: se o pH for $\leq 5,0$, deve-se utilizar a solução de extração nº 1; e se o pH for $> 5,0$, a solução de extração nº 2. Com o resultado de pH 8, a solução extratora mais adequada a ser utilizada é a solução número 2, pH $2,88 \pm 0,05$, uma vez que o pH é $> 5,0$ (ABNT, 2004). Entretanto devido aos modelos experimentais propostos, testou-se as soluções de pH menos ácido, a solução nº1, pH $4,93 \pm 0,05$, em pH 6,21 e pH 7,08 foram testadas em dois modelos vegetais e em um modelo animal.

Os ensaios preliminares com os modelos vegetais de *A. cepa* e *L. sativa* tiveram os seguintes grupos experimentais: I) grupo controle; II) solução extratora

pH 4,90; III) solução extratora pH 6,21 (ajustado); IV) solução extratora pH 7,08 (ajustado).

A Tabela 1 traz os resultados para os ensaios em modelos vegetais. A Figura 9 traz os resultados do ensaio em modelo animal, microcrustáceo *Artemia sp.*

Tabela 1- Resultados do ensaios toxicológicos em modelos vegetais

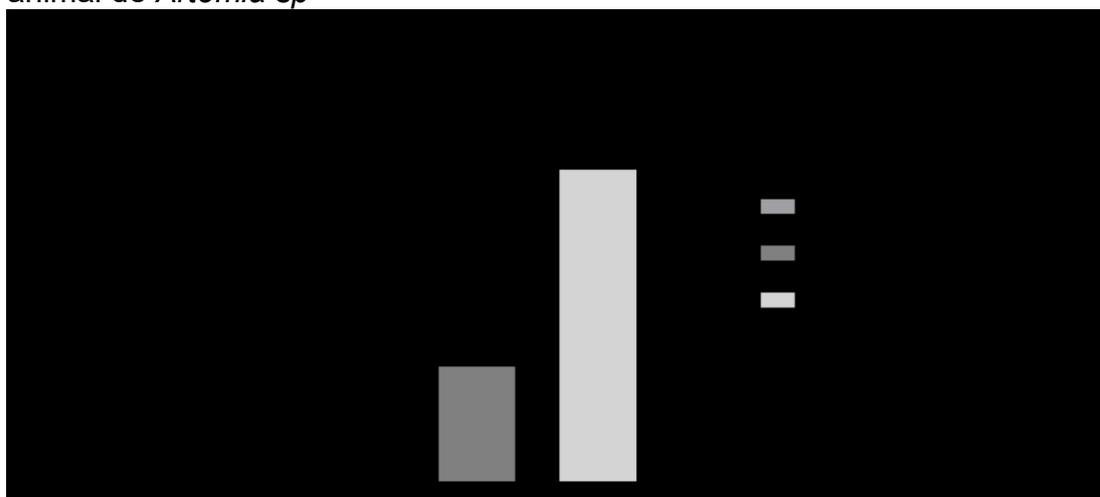
Grupo	N.S.G*	N.R.**
Grupo controle	9	30,67
Solução extratora pH 4,90	0	0
Solução extratora pH 6,21	0	0
Solução extratora pH 7,08	0	0

*N.S.G - Número médio de sementes germinadas. n=10*3

**N.R - Número médio de raízes. n=10*3

Fonte: Da autora, 2018.

Figura 4 – Resultados da avaliação toxicológica das soluções extratoras em modelo animal de *Artemia sp*



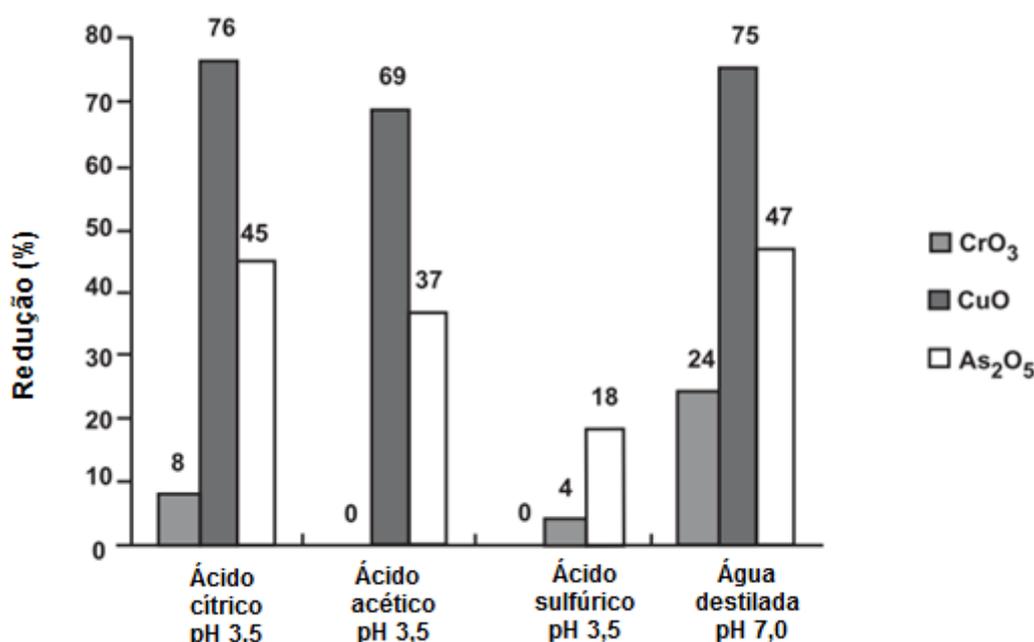
Controle: Água salinizada. (30 g/L). Demais grupos: soluções extratoras de ácido acético com pH 4,9, 6,21 e 7,08. *Diferença significativa em relação ao grupo controle. $p < 0,05$. ANOVA de uma via, *post-hoc* Tukey.

Fonte: Da autora, 2018.

Estes resultados evidenciam que o pH da solução extratora gera efeitos toxicológicos nos modelos experimentais propostos. Além disso, Shiau, Smith e Avellar (2000) realizaram estudo com três diferentes soluções extratoras ácidas e com água destilada para extração especificamente de CCA. Os autores constaram que os níveis de pH tiveram pouco impacto na extração dos metais Cr, Cu e As. A solução extratora de ácido acético, a mesma proposta pela NBR 10005:2004, não se

mostrou tão eficiente para extração dos metais de CCA, e a água com pH 7,0 se mostrou a solução extratora mais eficiente, o que pode ser conferido na Figura 5. O período de 24h de extração apresentou o maior pico percentual de extração, ocorrendo extração máxima em sete dias, mas com pouca diferença do percentual extraído em 24h.

Figura 5 - Percentual de redução dos metais Cr, Cu e As em madeira tratada com CCA, após 24h de extração com diferentes soluções extratoras



Fonte: (SHIAU; SMITH; AVELLAR, 2000).

Portanto, a água ultrapura com pH 7,0 foi a solução de extração utilizada, no período de 24h, já que houve pouco incremento no percentual de extração dos metais após sete dias (SHIAU; SMITH; AVELLAR, 2000).

3.1.2.2 Procedimento de lixiviação

O extrato lixiviado foi obtido através do método de lixiviação preconizado pela ABNT NBR 10005:2004 “Procedimento para obtenção de extrato lixiviado de resíduos sólidos”. Com adaptações específicas para extração do CCA, de acordo com Shiau; Smith; Avellar (2000).

Para extração, a proporção de (5:100, m/v) de sólido e solução extratora, 5 g de cinzas para cada 100 mL de água ultrapurificada, transferiu-se para frasco de

extração, manteve-se sob agitação magnética durante (18 ± 2) h a temperatura de até 25°C . Após o período de extração, a amostra foi filtrada em membrana de filtração média e assim foi obtido o extrato lixiviado (ABNT, 2004).

Este procedimento foi realizado separadamente para cada grupo de cinzas de madeira tratada e não tratada, e as amostras de lixiviados foram armazenadas temporariamente sob refrigeração, 4°C , para posteriores análises.

3.2 TESTES FÍSICO-QUÍMICOS

3.2.1 Análises de metais

A análise dos metais e metaloide do tratamento preservativo CCA, cromo, cobre e arsênio, foi realizada conforme *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, método 3120 B – Análise de Metais por espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION, 2012). O equipamento Agilent 720 ICP-OES (Santa Clara, CA USA) foi utilizado para as mensurações e as amostras foram preparadas por digestão com ácido nítrico. Esta análise foi realizada para ambos os lixiviados e cinzas brutas.

3.2.2 Análise de fenóis

A quantificação de fenóis foi realizada *conforme Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Método 5530 C – Método de extração com clorofórmio. Este é um método colorimétrico, no qual os extratos corantes da solução aquosa com clorofórmio foram coletados em cubetas limpas para medidas de absorvância a 460 nm, um espectrofotômetro DR 2800 (Hach, Loveland, CO, EUA). Amostras, soluções em branco e padrões foram preparadas da mesma maneira. A absorvância da amostra e dos padrões foi lida contra o branco a 460 nm. Uma curva de calibração foi construída plotando as leituras de absorvância contra a concentração de fenol em microgramas (determinada por soluções padrão). A curva de calibração foi verificada para garantir a reprodutibilidade ($r^2 \geq 0,9$) (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION, 2012).

3.3 TESTES TOXICOLÓGICOS

3.3.1 Testes com microrganismos

3.3.1.1 Método de microdiluição em caldo (concentração inibitória mínima)

O método de microdiluição em caldo seguiu as recomendações do CLSI (2018) com adaptações. Os lixiviados foram adicionados aos tubos cônicos tipo eppendorf a diferentes concentrações (0%, 25%, 45%, 65% e 85%), sendo diluídos em água destilada estéril. O meio de cultura caldo BHI 10 vezes concentrado será adicionado (100 µL) aos tubos. A suspensão bacteriana foi preparada na concentração de 1×10^8 UFC/mL e diluída em (1:10, v/v) e, em seguida, 50 µL desta suspensão foi adicionada. Os tubos foram incubados por 24 horas a 37°C sem agitação. Após a incubação, mensurou-se a densidade óptica em 664 nm por espectrofotometria, a fim de analisar o crescimento bacteriano. Este teste foi realizado para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, Gram-positiva e Gram-negativa, respectivamente.

3.3.1.2 Método de difusão em ágar

A sensibilidade de bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, e Gram-negativas, *Escherichia coli*, para a substância em estudo também foi avaliada utilizando-se 100 µL de cada amostra de lixiviado bruto (100%) por meio de difusão em meio ágar.

As amostras foram aplicadas em um orifício de 10 mm no meio de cultura padrão, *Plate Count Agar* (PCA) – disposto em placas de Petri contendo uma espécie de bactéria em conjunto com um controle grupo (H₂O) e incubado a 37°C por 18h. Após este período, a distância, quando presente, entre as bactérias em crescimento e a borda do orifício foi medida (em mm). A formação de um halo indica um efeito de inibição de crescimento devido à presença da substância teste (BORTOLOTTO et al., 2017).

3.3.2 Testes com modelos vegetais

3.3.2.1 *Ensaio toxicológico subagudo em Allium cepa*

A inibição do crescimento radicular em *A. cepa* foi observada para examinar a toxicidade subaguda dos lixiviados. Os espécimes de *A. cepa* foram obtidos de fonte comercial e expostos (n = 5) a 15 mL dos lixiviados diluídos em água mineral natural obtida comercialmente, nas concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100% em tubos cônicos à temperatura ambiente, por sete dias, no escuro. Neste período, as amostras dos lixiviados foram renovadas diariamente para manter o bulbo em contato constante com o lixiviado. Ao final do período de exposição, o comprimento da maior raiz de cada bulbo foi mensurado e a massa total das raízes. A inibição relativa do crescimento radicular e da biomassa radicular foi calculada e expressa em comprimento (cm) e massa (mg) (BORTOLOTTO et al., 2009).

3.3.2.2 *Teste subagudo de germinação de sementes de Lactuca sativa*

A germinação de sementes de *L. sativa* foi realizada de acordo com Bortolotto et al. (2017). As sementes (n =10) foram dispostas em papel filtro embebido em 2 mL do lixiviado em placa de Petri (90 mm) a temperatura ambiente, no escuro. Foram realizadas três repetições para cada concentração do lixiviado, 0%, 25%, 50%, 75% e 100%, a fim de identificar as concentrações tóxicas e subtóxicas. O percentual de sementes germinadas e o crescimento das plântulas foram determinados 72h após a exposição inicial. A germinação e o crescimento em cada concentração foram comparados ao grupo controle (0%).

3.3.3 **Testes com modelos animais**

3.3.3.1 *Ensaio com Artemia spp.*

A avaliação de toxicidade com *Artemia spp.* foi realizada de acordo com (NETTO et al., 2013). Uma solução de salina preparada com sal marinho (30 g/L) foi utilizada como meio de incubação para os cistos de *Artemia spp.* Indivíduos jovens (n = 10) foram expostos aos lixiviados em placas de múltiplos poços com 2 mL de cada concentração (0%, 25%, 50%, 75% e 100%) e o meio controle (0%). Cada um

foi replicado quatro vezes. Após 24h de exposição, o número de organismos mortos foi observado e registrado para determinação da concentração letal média (CL50) pela equação sigmoidal dose-resposta:

$$Y = inferior + \frac{(Superior - Inferior)}{1 + 10^{\log EC50 - X}} \quad (1)$$

A variável *inferior* é o valor Y (número de mortos) no platô inferior; *Superior* é o valor de Y no platô superior e LogEC50 é o valor de X (concentração do lixiviado) quando a resposta está na metade do caminho entre *Inferior* e *Superior* (GRAPHPAD SOFTWARE, 2016).

3.3.4 Teste de citotoxicidade *in vitro*

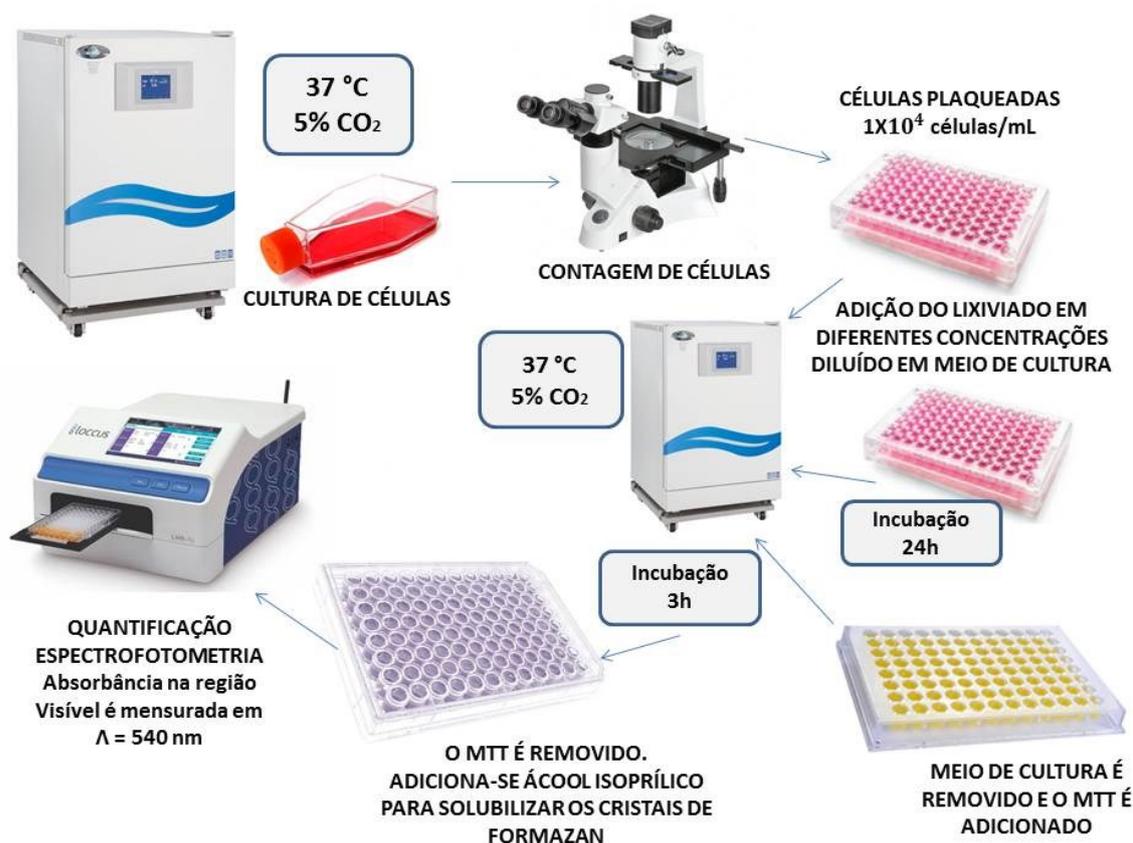
A citotoxicidade das células NIH3T3 foi avaliada pelo ensaio MTT, ilustrado pela Figura 8, no qual a viabilidade das células foi mensurada pelo método colorimétrico utilizando o reagente MTT [(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan]. A determinação da viabilidade celular por meio da atividade mitocondrial baseia-se na quantificação diretamente proporcional da redução do MTT, um sal solúvel em água e de coloração amarela, em formazan, um sal insolúvel em água de coloração roxa. A quantificação foi realizada por espectrofotometria na região do espectro visível, comprimento de onda de 540 nm (MOSMANN, 1983).

As células de fibroblastos linhagem NIH3T3 foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade dos lixiviados de cinzas pesadas de madeira tratada com CCA (LCPMT-CCA) e lixiviado de cinzas pesadas de madeira não tratada (LCPMNT), pelo ensaio MTT. As células foram cultivadas com meio DMEM completo (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com bicarbonato de sódio (3,7 g/L) e contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina (10 U.L/mL). O cultivo de células foi em garrafas de plástico de 25 cm² mantidas em incubadora umidificada com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C (DANIELSEN et al., 2009).

Após a incubação, as células foram plaqueadas a 1x10⁴ células/poço em uma placa de 96 poços e incubadas nas mesmas condições de cultura por 24h. Após o tempo de incubação (24h), as células foram incubadas com LCPMT-CCA e LCPMNT, em seis concentrações: 1, 2, 5, 10, 25 e 50%. O grupo controle foi

incubado apenas com meio DMEM completo. Após o tempo de incubação (24h), os tratamentos foram descartados e 100 μ L de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foram adicionados em cada poço e incubados por 3h (CO₂ a 5%, 37°C) para permitir a reação de formação de formazan. O MTT foi removido e 100 μ L de álcool isopropílico foram adicionados para dissolver os cristais de formazan e a absorbância foi medida a 540 nm usando um espectrofotômetro de microplacas SpectraMax M3 (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA). Os ensaios foram realizados em triplicatas, com três poços para cada concentração, e os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em comparação com o respectivo controle de grupo.

Figura 6 - Fluxograma do ensaio de citotoxicidade com MTT



Fonte: Da autora, 2018.

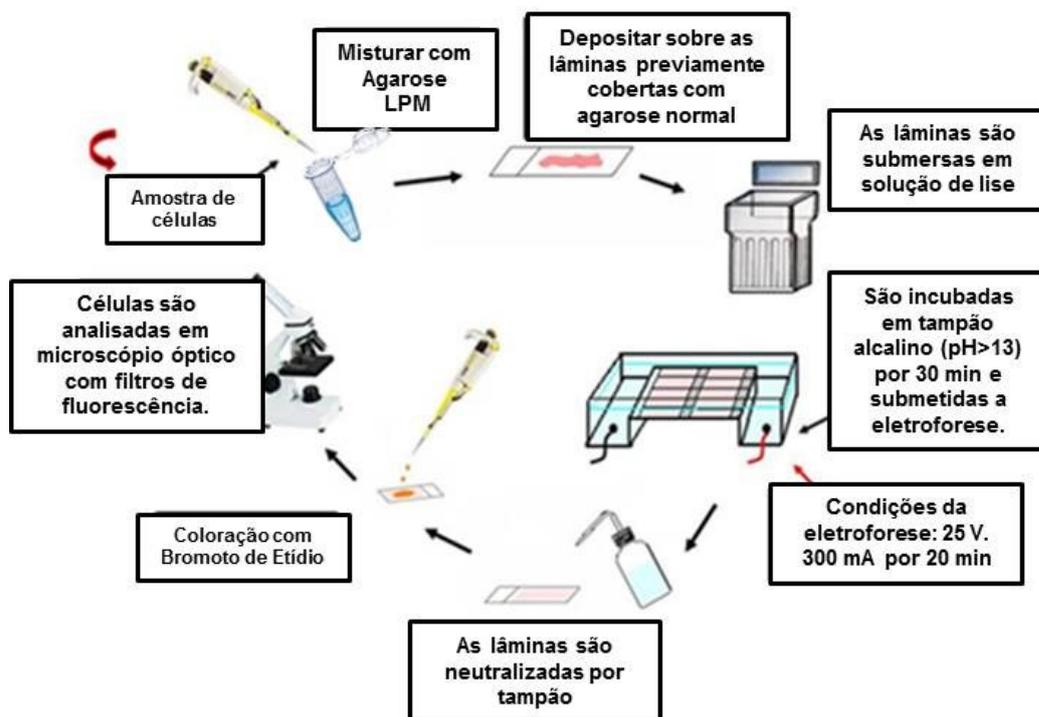
3.4 TESTES GENOTOXICOLÓGICOS

3.4.1 Ensaio cometa

As células NIH3T3 foram plaqueadas, 2×10^5 células/poço em uma placa de cultura de 24 poços, e incubadas por 24h (37 °C, 5% de CO₂). Após o período de incubação, as células NIH3T3 foram tratadas com LCPMT-CCA e LCPMNT, nas concentrações de 2, 5 e 10%, e incubadas por 24h. Após o tempo de incubação, as NIH3T3 foram desaderidas com tripsina/EDTA. Em sequência, as células foram centrifugadas (2x) a 1000 rpm por 1 minuto e ressuspensas em tampão fosfato (PBS).

O ensaio do cometa foi realizado em condições alcalinas conforme descrito por Singh et al (1988) com algumas modificações de Tice et al (2000). A suspensão de células foi embebida em agarose de baixo ponto de fusão (0,75%, m/v), esta mistura foi transferida para uma lâmina de vidro pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1%) e foi posteriormente coberta por uma lamínula e refrigerada por 5 minutos a 4°C. As lamínulas foram removidas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a aproximadamente 4°C *overnight*. Após este período, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 30 minutos para o desenovelamento do DNA, e a corrida eletroforética, realizada no mesmo tampão a 25 V e 300 mA por 20 minutos. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e fixadas em etanol. Ao final, as lâminas foram umidificadas com água ultrapura e o DNA foi corado com 15 µL de solução de brometo de etídio (Sigma-Aldrich, USA) para posterior análise em microscópio invertido de fluorescência Eclipse Ti-U (Nikon, Japão) equipado com iluminador de epi-fluorescência no filtro verde (FITC), excitação a 480/30 nm e emissão a 535/40 nm, com aumento de 200x. Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta fraca. Todas as lâminas foram codificadas para análise cega.

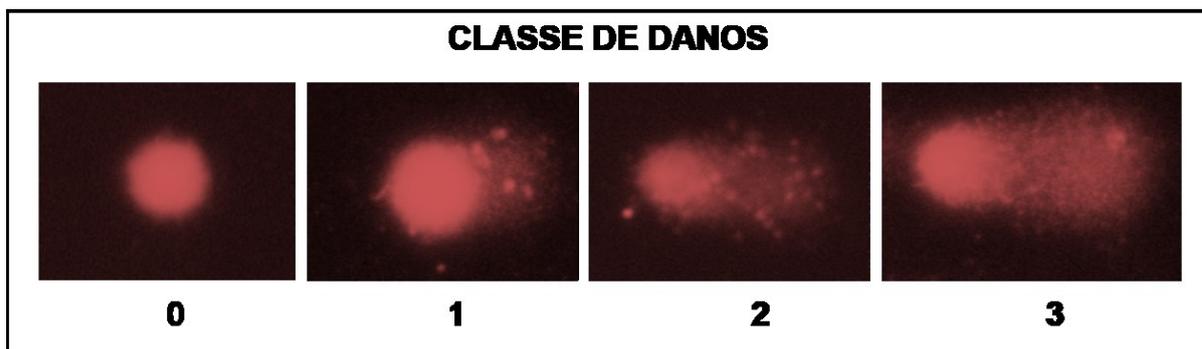
Figura 7 - Fluxograma das etapas do ensaio cometa



Fonte: Da autora, 2019.

A análise do ensaio cometa foi realizada num total de 100 células por lâmina, divididas em duplicata, ou seja, contagem de 50 células por poço da lâmina. A avaliação dos danos foi por meio de quatro níveis, como ilustra a Figura 1, conforme a extensão da cauda do cometa, diretamente proporcional ao nível do dano, classificados em dano zero, pela ausência da cauda, até dano três, pelo máximo comprimento de cauda. A quantificação foi por meio do índice de dano (ID) para cada bioindicador, com variação de 0 a 300, para cem células analisadas, e pela frequência de danos (FD) em percentual, em cada amostra, confrontando o número de células com cauda pelo número de células sem cauda. O escore visual de cometas é considerado um método de avaliação bem validado pelas diretrizes internacionais e recomendações para o ensaio do cometa, o qual tem uma alta correlação com a análise de imagem por computador (COLLINS et al., 1997).

Figura 8 - Classes de danos obtidas pelo Teste Cometa



Fonte: Da autora, 2019.

Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

3.5 ENSAIO DE HEMÓLISE *EX VIVO*

A atividade hemolítica foi avaliada pelo ensaio de hemólise *in vitro* de acordo com Yu; Malugin; Ghandehari (2011). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Universidade do Extremo Sul Catarinense, número do protocolo CAAE 14560419.9.0000.0119.

O sangue humano foi coletado, 1 mL de cada um dos três voluntários, em tubo com concentração de citrato de sódio a 3,2% (tubo de tampa azul). Os eritrócitos foram isolados por centrifugação (1.500 rpm, por 10 min) no próprio tubo de coleta. O sobrenadante (soro) e uma camada branca (monócitos) entre os eritrócitos e o soro, após centrifugação, foram removidos com o auxílio de pipeta pasteur. Após, os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina (NaCl a 0,9%): foram ressuspensos em aproximadamente o mesmo volume de solução salina, agitados manualmente e centrifugados (1.500 rpm, por 10 min) com remoção do sobrenadante a cada vez com o auxílio de pipeta pasteur. A dispersão das células com solução salina (usando metade do volume de eritrócitos) foi diluída para obter a dispersão de estoque de eritrócitos.

A análise do teste de diluição foi realizada por espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 540nm. A absorbância deve estar entre 2,2 e 1,8. Portanto, em um tubo eppendorf, foram adicionados 50 µL da dispersão eritrocitária

a 950 µL de água deionizada, em outro tubo foram adicionados 70 µL da dispersão eritrocitária a 930 µL de água deionizada, homogeneizados e transferidos 100 µL para uma placa de 96 poços. A diluição ideal foi (70:930, v/v) da dispersão de eritrócitos em água deionizada. Essa diluição foi realizada com todas as amostras, para cada concentração final de (25, 50, 75 e 90%) de lixiviado de cinzas de madeira tratada com CCA e a mesma concentração final de lixiviado de cinzas de madeira não tratada, todas em triplicata – uma de cada voluntário. O controle positivo foi a água deionizada com a dispersão de eritrócitos (930:70, v/v) e o controle negativo é a solução salina (NaCl a 0,9%) com a dispersão de eritrócitos (930:70, v/v), ambos em triplicata – um de cada voluntário.

Todas as amostras foram incubadas sob agitação suave (350 rpm) por 2h a 37°C (termobloco). Após o tempo de incubação, as amostras foram agitadas manualmente e centrifugadas (10000 rpm, por 5 min) para separar os hematócitos intactos e as amostras foram fotografadas. Depois, 100 µL do sobrenadante de cada tubo eppendorf (em triplicata) foram transferidos para uma placa de 96 poços e analisados a 540 nm no espectrofotômetro de placas.

A taxa de hemólise foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Taxa de hemólise (\%)} = \frac{(MA-MCN)}{(MCP-MCN)} \times 100 \quad (2)$$

onde: MA = Média da absorbância da amostra (n = 3); MCN= Média da absorbância do controle negativo (n=3); MCP= Média da absorbância do controle positivo (n=3).

3.5.1 Ensaio de hemólise ex vivo por citometria de fluxo

A análise da citometria de fluxo foi realizada usando um FACSVerse, que foi calibrado com o *FACSuite CS&T Research Beads* lote 81165 (ambos BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). O protocolo para ensaio de hemólise foi o mesmo descrito acima. Para ensaios de citometria de fluxo, os eritrócitos tratados com o lixiviado de cinzas de fundo de madeira tratado com CCA e o lixiviado de cinzas de fundo de madeira não tratado nas concentrações de 25, 50, 75 e 90% foram agitados suavemente por 2h a 37°C. Após, as hemácias foram transferidas para tubos de ensaio e analisadas em plotagem de dispersão direta (FSC) e dispersão lateral (SSC). O estudo foi limitado a 10.000 eventos usando um laser azul de 488

nm. Os perfis de dispersão foram então analisados com o software BD FACSuite v1.0.6.5230 (BD Biosciences 2011, San Jose, CA, EUA) (YAMAMOTO et al., 2014; GHOSH et al., 2016).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios toxicológicos serão submetidos a análise de variância (ANOVA) não paramétrico, com testes *post hoc* aplicáveis a cada experimento. Estes testes serão realizados por meio do software GraphPad Prism 7.0, com significância de $p < 0,05$. Os resultados serão expressos em média \pm Desvio Padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TESTES FÍSICO-QUÍMICOS

A quantidade total de metais, fenóis e medição de pH dos lixiviados é apresentada na Tabela 2 e na Tabela 3, respectivamente. As concentrações de arsênio e cromo foram de 59,45 e 54,28 mg/L no lixiviado de cinzas pesadas de madeira tratada com CCA (LCPMT-CCA) e 0,70 mg/L, 0,30 mg/L, foram encontradas em lixiviados de cinzas pesadas de madeira não tratada (LCPMNT), respectivamente. Os lixiviados não apresentaram quantidade significativa de cobre. No entanto, nas amostras de cinzas de madeira tratadas com CCA, o teor de arsênio, cobre e cromo foi 4852,50, 3295,00 e 4882,50 mg/kg e 63,02, 71,47 e 73,70 mg/kg, respectivamente. A presença de cobre nas amostras de cinzas mostra que essas amostras são potencialmente mais tóxicas que as amostras de lixiviados.

Tabela 2 - Teor total de metais e fenóis nas amostras de lixiviados e teor total de metais nas amostras de cinzas pesadas

Parâmetro	Amostras			
	LCPMT-CCA (mg/L)	LCPMNT (mg/L)	CPMT-CCA* (mg/kg)	CPMNT** (mg/kg)
Arsênio	59,45	0,70	4852,50	63,02
Cobre	< 0,01	< 0,01	3295,00	71,47
Cromo	54,28	0,30	4882,50	73,70
Fenóis	0,005	0,015	-	-

*Cinzas pesadas de madeira tratada com CCA; **Cinzas pesadas de madeira não tratada.

Metais: SMEWW - Method 3120 B (ICP - OES)

Fenóis: SMEWW - Method 5530 C / EPA 9065

O tratamento preservativo CCA utilizados nas amostras de madeira neste trabalho foi a base de óxidos de cobre (CuO), de cromo (CrO₅) e de arsênio (As₂O₅). Neste contexto, estudos com análise de microscopia eletrônica indicaram que os compostos metálicos e metaloides do tratamento de CCA a base de óxidos foram aglomerados com componentes minerais da madeira. Além disso, a abundância de Cr, Cu e As no produto de pirólise pode ser explicada pela alta concentração inicial impregnada na madeira desses metais e metaloides. Os óxidos de CCA,

geralmente, contêm metais e metaloides na seguinte ordem decrescente de concentrações (% em massa): Cr>As>>Cu (HELSEN; HACALA, 2006). Esta proporção de concentração muito maior de cromo e arsênio em relação ao cobre é confirmada nos resultados das análises das cinzas, no qual a concentração de arsênio e cromo é respectivamente de 4852,50 e 4882,50 mg/kg, enquanto que de cobre é de 3295,00 mg/kg.

Na madeira tratada com CCA, o arsênio é principalmente ligado ao Cr como arsenato de Cr (CrAsO_4) e frequentemente associado ao Ca no resíduo de cinzas, e o As presente nesta forma é mais resistente à volatilização em comparação com muitos outros compostos As (PEDERSEN; OTTOSEN, 2006). Durante a pirólise da madeira tratada com CCA a 450°C , os compostos de CCA podem formar produtos de reação complexos como $\text{Cr}_2\text{As}_4\text{O}_{12}$ e As_2O_3 , que foram identificados por análises de TEM convencional por difração de elétrons de área selecionada por Hata et al. (2003). Além disso, também foi avaliada a volatilidade do arsênico sob temperaturas de até 500°C e, às vezes, por até por 1h, condições semelhantes às testadas neste trabalho. Os autores concluíram que mais de 20% do arsênico é perdido pela volatilização do composto de arsênio que não reagiu a 300°C , e provavelmente o arsênico é liberado como As_4O_6 , que é muito tóxico e difícil de capturar (HATA et al., 2003).

Além disso, o processo de lixiviação não foi capaz de extrair o teor de cobre identificado na amostra de cinzas, uma vez que há ausência de cobre na amostra de LCPMT-CCA (Tabela 1). Isso sucedeu provavelmente porque o óxido de cobre, CuO , é insolúvel em água, enquanto os óxidos de arsênio e cromo são solúveis ((HSDB), 2001; CHOU et al., 2007).

Tabela 3 – Quantificação de pH nas amostras de lixiviados

Parâmetro	Amostra (média \pm DP)		
	Água ultrapura	LCPMT-CCA	LCPMNT
pH	7.00 \pm 0.23	8.60 \pm 0.23	10.07 \pm 0.23

A água ultrapura foi utilizada como solução de extração, porque realizaram-se testes preliminares com soluções ácidas, relativamente mais eficientes na extração de óxido de cobre e cromo, porém os resultados mostraram que o pH da solução de extração gera efeitos toxicológicos nos modelos experimentais propostos

neste trabalho. Além disso, Shiau, Smith e Avellar (2000) realizaram um estudo com três soluções diferentes de extração ácida e água destilada, especificamente para extração de CCA. Os autores descobriram que os níveis de pH tiveram pouco impacto na extração de metais Cr, Cu e As. Água com pH 7,0 mostrou-se tão eficaz na remoção de produtos químicos de CCA quanto os tratamentos ácidos, mas eles apontaram que o processo de autoclavagem da madeira, por ser um ambiente ácido, pode facilitar a lixiviação de produtos químicos de CCA.

4.2 TESTES TOXICOLÓGICOS

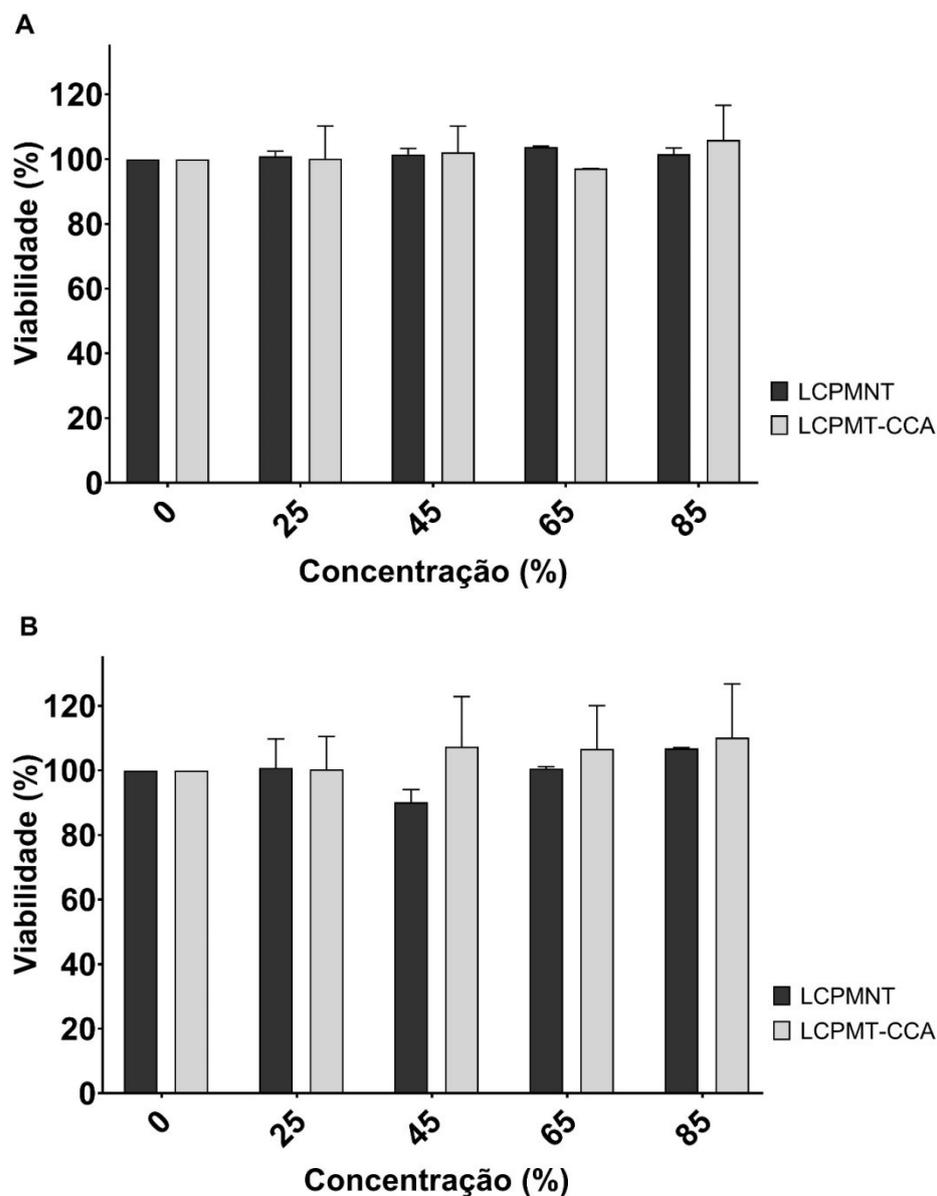
Uma vez que os testes físico-químicos revelaram a presença de contaminantes potencialmente tóxicos nos lixiviados das amostras, e para integrar as relações concentração-resposta por esses dados químicos, foram realizados alguns bio-ensaios com diferentes modelos experimentais para determinar o potencial tóxico das amostras de lixiviados.

4.2.1 Testes com microrganismos

4.2.1.1 Método de microdiluição em caldo (concentração inibitória mínima)

As amostras LCPMT-CCA e LCPMNT não indicaram toxicidade para as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, ilustradas pela Figura 9.

Figura 9 - Resultados da viabilidade das bactéria *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (ambas 1×10^8 UFC/mL) de exposição a LCPMT-CCA e LCPMNT



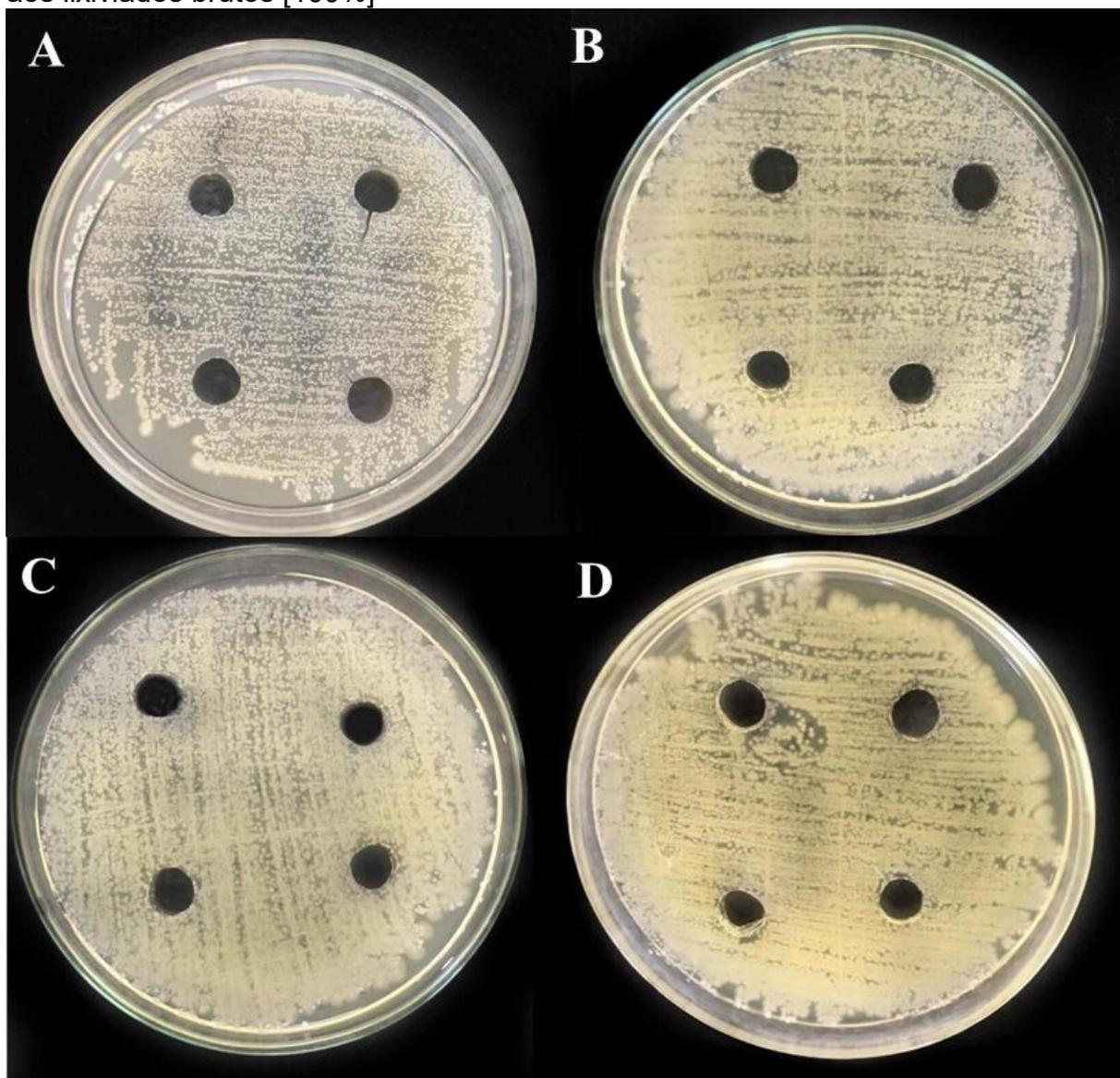
A) *Escherichia coli* 1×10^8 UFC/mL expostas a diversas concentrações de LCPMT-CCA e LCPMNT.
 B) *Staphylococcus aureus* 1×10^8 UFC/mL expostas a diversas concentrações de LCPMT-CCA e LCPMNT. As barras indicam a média \pm DP de dois experimentos ($n_{\text{total}} = 6$) ($p < 0,05$; ANOVA de duas vias. Teste *post hoc* de Bonferroni). Não houve resultados estatisticamente significativos em relação aos grupos controle (0%).

4.2.1.2 Método de difusão em ágar

Corroborando com os resultados do ensaio anterior, as mesmas bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* não foram sensíveis à exposição aos lixiviados de cinzas de madeira tratada com CCA e de madeira não tratada, uma vez

que, como é passível de verificar na Figura 10, não há formação de halo de inibição entre a cultura bacteriana e o poço de aplicação destas amostras. Cabe salientar que estes micro-organismos não são comumente utilizados em análises ambientais, e sim a bactéria *Vibrio fischeri* é mais indicada para estas análises. Entretanto o interesse na aplicação de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* é pela representação de gram negativa e gram positiva respectivamente.

Figura 10 - Bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* 1×10^8 UFC expostas aos lixiviados brutos [100%]



A) Cultura de *Escherichia coli* 1×10^8 UFC/mL em meio de cultura padrão *Plat Count Agar* – PCA. B) Cultura de *Staphylococcus aureus* 1×10^8 UFC/mL em meio de cultura padrão *Plat Count Agar* – PCA. Nos poços superiores foram aplicados 100 μ L de lixiviado bruto [100%] de cinzas de madeira tratada com CCA e nos poços inferiores foram aplicados 100 μ L de água destilada. C) Cultura de *Escherichia coli* 1×10^8 UFC/mL em meio de cultura padrão *Plat Count Agar* – PCA. D) Cultura de *Staphylococcus*

aureus 1×10^8 UFC/mL em meio de cultura padrão *Plat Count Agar* – PCA. Nos poços superiores foram aplicados 100 μ L de lixiviado bruto [100%] de cinzas de madeira não tratada e nos poços inferiores foram aplicados 100 μ L de água destilada.

Os resultados nos dois métodos de exposição de bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* mostram que estas possuem algum mecanismo bacteriano de resistência aos compostos do LCPMT-CCA, pois não há diferença em relação aos grupos controle. Mecanismos de resistência ao cromato e arsênico têm sido relatados como sistemas para reparar danos no DNA e proteger do estresse oxidativo; mecanismos de resistência podem ser codificados por plasmídeos ou genes cromossômicos, estratégias como redução específica ou inespecífica de Cr (VI), e processos associados à homeostase do enxofre ou do ferro (RAMÍREZ-DÍAZ et al., 2008).

Em vários trabalhos, (POLJSK et al., 2010; RAMÍREZ-DÍAZ et al., 2008; VITI et al., 2014) foi relatada a importância da energia e da redução de potência necessárias para combater os efeitos tóxicos da exposição ao Cr (VI), reduzindo atividades e mecanismos de reparo. Um gene da família de enzimas málicas (ME) tem um papel importante, dado que reduz o poder de reparar os danos celulares causados pelo estresse oxidativo em plantas, animais e bactérias. Finalmente, os microrganismos reagem ao Cr (VI) combinando redes celulares atuando em vários níveis, como a redução de energia gerada pelo metabolismo da energia basal, proteção ao estresse oxidativo das proteínas, reparo do DNA, enzimas de desintoxicação, aquisição e homeostase e aquisição de ferro e enxofre e bombas efluxo (VITI et al., 2014).

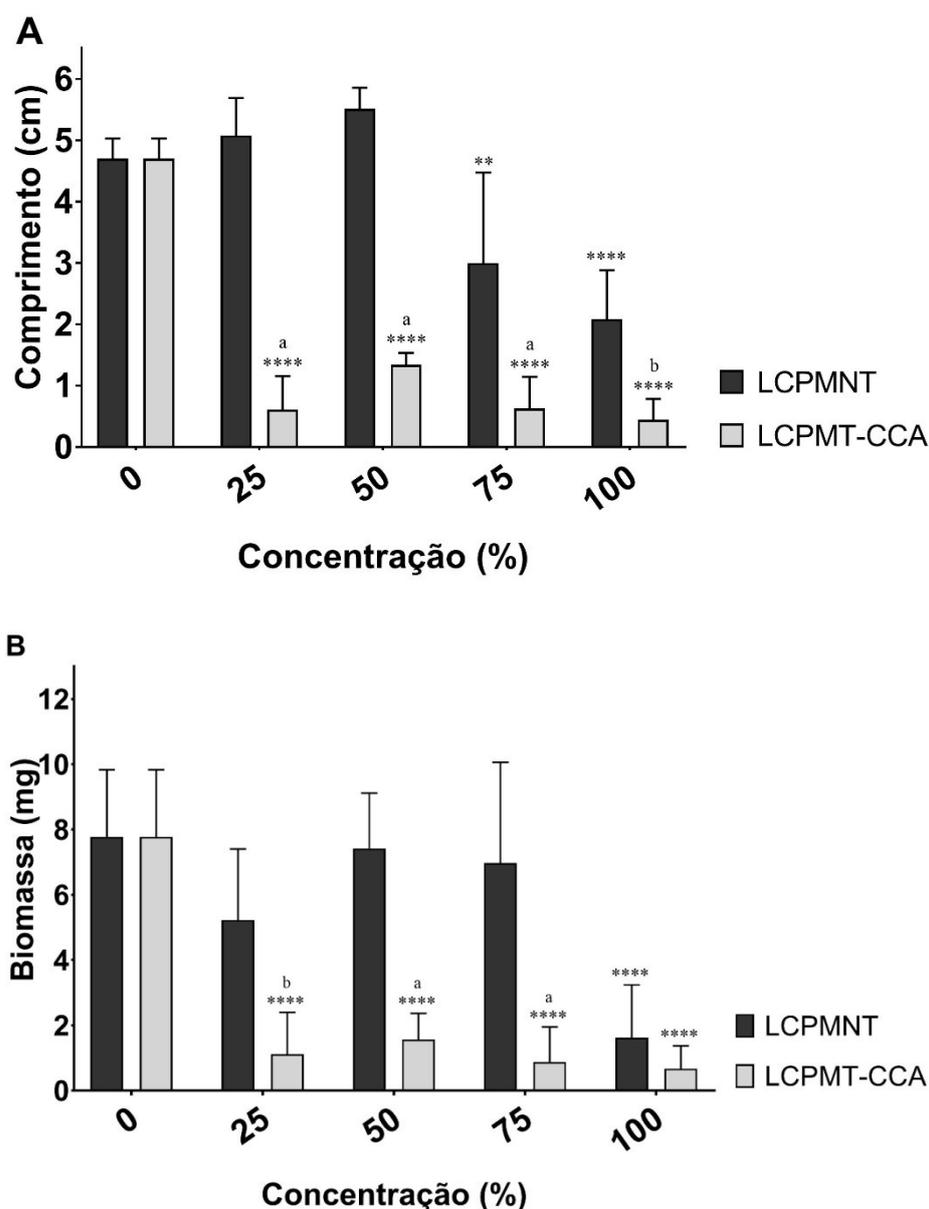
4.2.2 Testes com modelos vegetais

4.2.2.1 Ensaio toxicológico subagudo em *Allium cepa*

As raízes recém-nascidas dos bulbos de *A. cepa* foram expostas durante sete dias a diferentes concentrações de lixiviados (LCPMT-CCA) (25–100%), mostrando uma diminuição significativa no comprimento da raiz (Figura 11A) e biomassa (Figura 11B) quando comparadas ao controle grupo. Quando os bulbos de *A. cepa* foram expostos a sete dias a diferentes concentrações de lixiviados

(LCPMNT) (25–100%), não houve diferença em comparação ao grupo controle com as concentrações de 25 e 50%, mas nas concentrações de 75 e 100%, as raízes das recém-nascidas também apresentaram diminuição significativa no comprimento da raiz (Figura 11A). Em termos de biomassa, apenas a concentração de 100% deste lixiviado apresentou diminuição significativa (Figura 11B).

Figura 11 - Resultados dos efeitos tóxicos dos dois lixiviados, LCPMNT e LCPMT-CCA, em bulbos de *A. cepa* expostos a diferentes concentrações (25–100%)



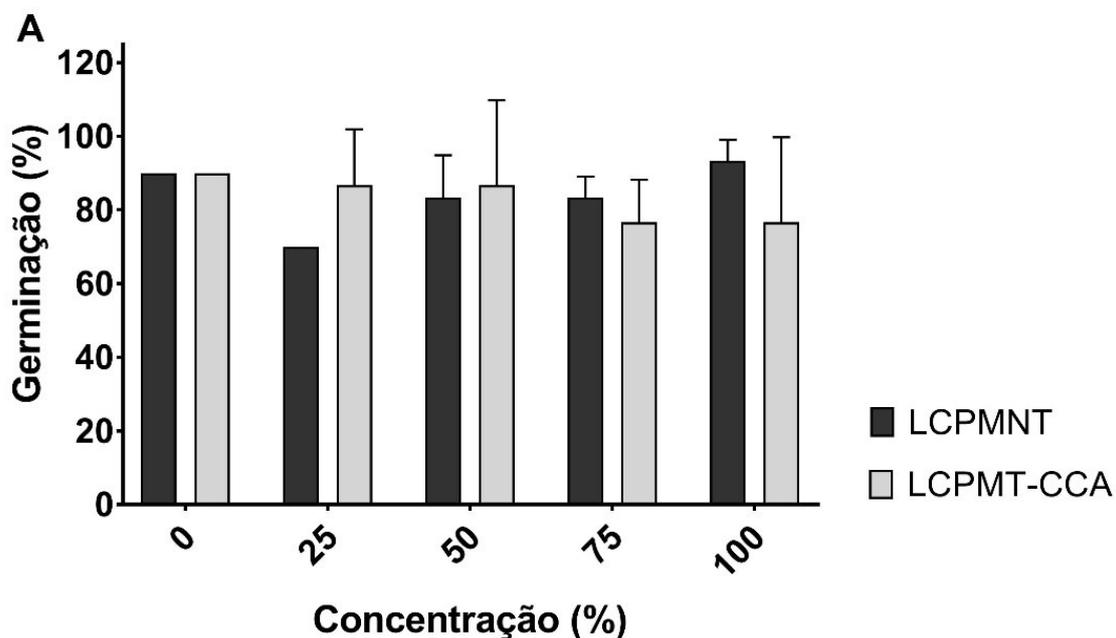
As barras indicam a média \pm DP de dois experimentos ($n_{\text{total}} = 6$) em termos de comprimento radicular (A) e biomassa radicular (B). ^{****}Estatisticamente significativo comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$; ANOVA de duas vias. Teste *post hoc* de Bonferroni). ^{**}Estatisticamente significativo comparado ao grupo controle ($p < 0,006$; ANOVA de duas vias. Teste *post hoc* de Bonferroni). ^aEstatisticamente significativo comparado na mesma concentração entre LCPMNT e LCPMT-CCA ($p < 0,0001$; ANOVA de duas vias. Teste *post hoc* de Bonferroni). ^bEstatisticamente significativo

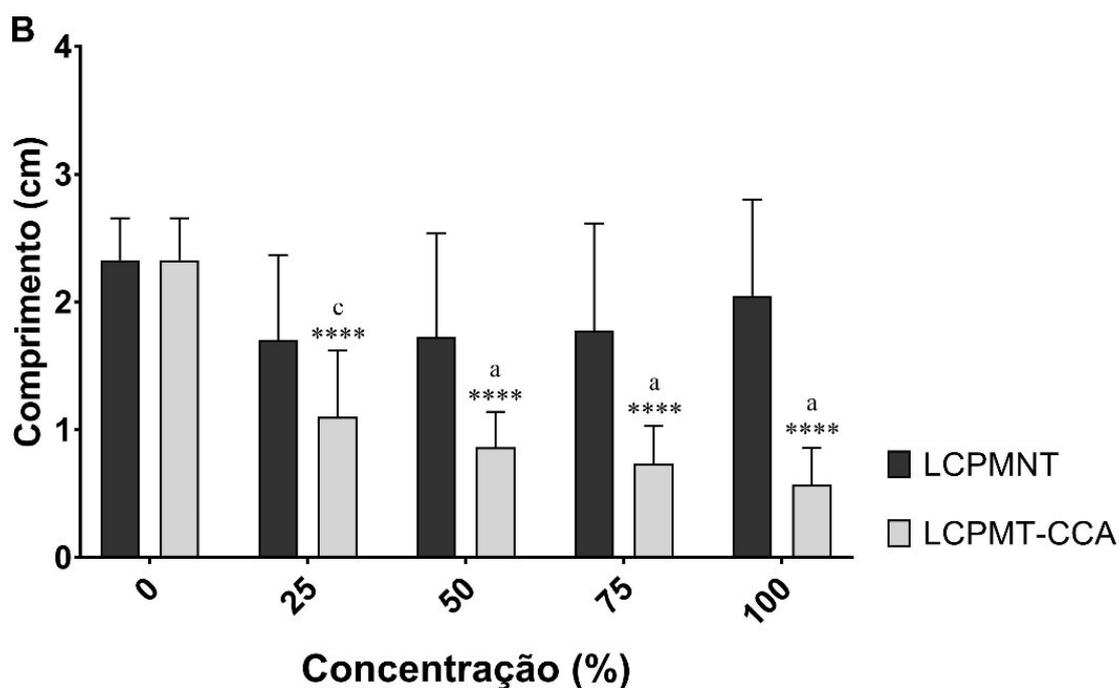
comparado entre LCPMNT e LCPMT-CCA, ambos na mesma concentração ($p < 0,007$; ANOVA de duas vias. Teste *post hoc* de Bonferroni).

4.2.2.2 Teste subagudo de germinação de sementes de *Lactuca sativa*

Sobre a germinação das sementes, não houve resultados estatisticamente significativos em comparação aos grupos controle (0%), conforme apresentado na Figura 12A. Em outras palavras, os dois lixiviados não promovem alterações nos níveis de germinação das sementes. No entanto, LCPMT-CCA foi capaz de promover efeitos subtóxicos, levando à inibição do crescimento radicular à medida que a concentração aumentou. Isso foi estatisticamente significativo comparado aos grupos controle e comparado entre os dois grupos LCPMNT e LCPMT-CCA na mesma concentração, conforme apresentado na Figura 12B.

Figura 12 - Germinação de sementes de *Lactuca sativa* e crescimento radicular após exposição de dois lixiviados, LCPMNT e LCPMT-CCA, a diferentes concentrações (25–100%)





As barras indicam a média \pm DP de dois experimentos ($n_{\text{total}} = 60$) em termos de germinação (A) e comprimento da raiz (B). ****Estatisticamente significativo comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$; ANOVA de duas vias. Teste *post hoc* de Bonferroni). ^aEstatisticamente significativo comparado entre grupos LCPMNT e LCPMT-CCA na mesma concentração ($p < 0,0001$; ANOVA de duas vias. Teste *post hoc* de Bonferroni). ^cEstatisticamente significativo comparado entre os grupos LCPMNT e LCPMT-CCA, ambos na mesma concentração ($p < 0,05$; ANOVA de duas vias. Teste *post hoc* de Bonferroni).

A inibição do crescimento radicular e da biomassa radicular também foi identificada por Patra, Paradhan e Patra (2018), que utilizaram espécimes de capim-limão em concentrações de cromo (VI). Os efeitos tóxicos promovidos pelo Cr bloquearam o fornecimento de nutrientes da raiz para a região da parte aérea, induzindo a inibição do crescimento e desenvolvimento normal da planta (PATRA; PRADHAN; PATRA, 2018). Isso também é verificado nos resultados deste trabalho, com amostras de *A. cepa* e *L. sativa* expostas ao lixiviado contendo cromo, LCPMT-CCA. A exposição ao LCPMT-CCA fomentou a inibição do crescimento radicular e inibição de aumento de peso, de modo que as sementes de *L. sativa*, apesar de germinarem, apresentaram alterações no desenvolvimento radicular normal. Além disso, Patra, Paradhan e Patra (2018), também investigaram as alterações metabólicas por análises de enzimas como peroxidase, catalase e super óxido dismutase (SOD). O nível dessas enzimas oxidativas cresceu nas raízes e brotos com aumento da concentração de cromo aplicada, o que provavelmente levou a uma mudança gradual para um metabolismo oxidativo. Ou seja, esses resultados obtidos por Patra, Paradhan e Patra (PATRA; PRADHAN; PATRA, 2018) sugerem

que o Cr (IV) induz estresse oxidativo em plantas, levando a danos oxidativos durante o crescimento e alterações metabólicas nas plantas. Esse mecanismo fisiopatológico também pode ter culminado nos efeitos tóxicos encontrados nas raízes de *A. cepa* e *L. sativa*, uma vez que o lixiviado LCPMT-CCA a que os indivíduos de *A. cepa* e *L. sativa* foram expostos, e suas cinzas, apresentaram altos níveis de cromo (Tabela 2).

A exposição de plantas ao arsênico tem efeitos deletérios semelhantes aos efeitos desencadeados pelo cromo, bem como aqueles encontrados nos resultados de exposição do LCPMT-CCA. O metaloide As é capaz de inibir a proliferação radicular e o desenvolvimento fisiológico, reduzindo ou impedindo o crescimento de biomassa, resultando na restrição da capacidade reprodutiva das plantas. O mecanismo é acionado como uma resposta à exposição e ao acúmulo de As na biomassa, que gera uma mudança drástica nos parâmetros de estresse oxidativo, como peroxidação lipídica, acúmulo de H₂O₂, oxidabilidade das raízes e atividades de enzimas antioxidantes como as desencadeadas pelo cromo (ALAM et al., 2019).

Estudos sobre a aplicação de cinzas ricas em metais e metaloides pesados relatam que esse metal/metaloide pesado é biodisponível e fitotóxico, causando efeitos adversos à biomassa da planta. Em um estudo, foi avaliada a adição de cinzas ricas em metais/metaloides pesados no solo com cultura de azevém (*Lolium perenne L.*), o qual acumulou maiores concentrações de As e Cr no azevém em comparação ao solo controle. Além disso, o pH dos solos aumenta após a adição de um suplemento de cinzas, levando à lixiviação de metais alcalinos; os efeitos do pH mudam ao longo do tempo, influenciando a mobilidade do metal e metaloide (MOLLON et al., 2016). Isto sugere que a mobilidade dos compostos do CCA, e capacidade de lixiviação dos mesmos em solo, é um fator importante na relação de parâmetros físico-químicos, pH do solo e do lixiviado, com as respostas ecotóxicas obtidas nos indivíduos de *A. cepa* e *L. sativa* foram expostos ao LCPMT-CCA.

Um estudo, em escala laboratorial, de transporte e acúmulo de compostos de lixiviados de madeira tratadas com CCA nos solos mostrou que o As foi o metal(oide) mais móvel, seguido pelo cromo, e o cobre foi o mais retido nas colunas do solo. Ambos acumularam na camada superior do solo, o que contribui à preocupação com os impactos à saúde humana e impactos às plantas (DAGAN;

BITTON; TOWNSEND, 2006). Além disso, a mobilidade dos compostos dos lixiviados de madeira tratados com CCA apresenta, desta forma, potencial de contaminação das águas subterrâneas, uma vez que em outro estudo de coluna de solo sugeriu-se que tanto As quanto Cr são os mais solúveis dos metais avaliados, com a lixiviação das cinzas sendo rápida (DAGAN; BITTON; TOWNSEND, 2006; MOLLON et al., 2016).

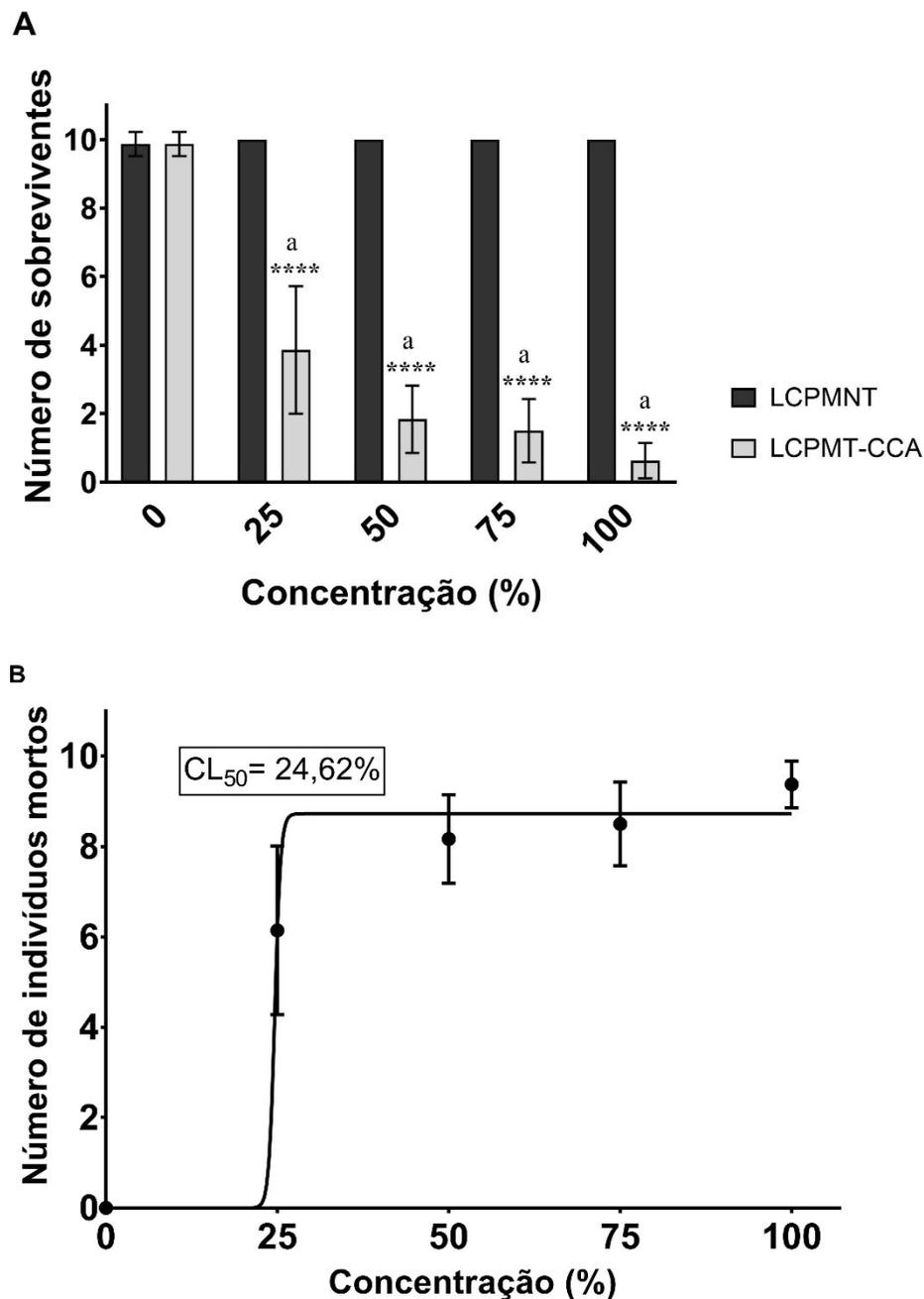
Ademais, quando metais e metaloides como cromo e arsênico estão presentes no solo, eles são absorvidos e acumulados nas plantas. Ao ingerir essas plantas, esses metais podem ser absorvidos por seres humanos ou outros organismos em níveis tróficos mais altos da cadeia alimentar(MOLLON et al., 2016). Esse pode ser um dos mecanismos de impactos ecotoxicológicos das amostras de LCPMT-CCA, promovendo efeitos tóxicos nas plantas e potencialmente nos seres humanos, aumentando o risco à saúde com o consumo de tecido vegetal contaminado.

4.2.3 Testes com modelos animais

4.2.3.1 Ensaio com Artemia spp.

Os resultados do ensaio de toxicidade com *Artemia spp.* é mostrado na Figura 13. O lixiviado de cinzas pesadas de madeira não tratada, LCPMNT, não mostrou grau de letalidade para os organismos expostos nas diferentes concentrações testadas, e todos os organismos sobreviveram no período exposto (Figura 13A). Porém o lixiviado LCPMT-CCA apresentou grau de letalidade aos organismos expostos proporcionalmente ao aumento de sua concentração, apresentando valor para CL₅₀ de 24,62% (Figura 13B).

Figura 13 - Resultados de efeitos dos lixiviados LCPMNT e LCPMT-CCA sobre indivíduos de *Artemia spp.*



As barras indicam a média \pm DP de dois ensaios ($n_{\text{total}} = 80$) em termos de letalidade dos organismos expostos (A). ****Estatisticamente significativo comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$; ANOVA de duas vias. Teste *post hoc* de Bonferroni). ^aEstatisticamente significativo comparado entre os grupos LCPMNT e LCPMT-CCA, na mesma concentração ($p < 0,0001$; ANOVA de duas vias. Teste *post hoc* de Bonferroni). Os pontos indicam a média \pm DP de dois ensaios ($n_{\text{total}} = 80$) no gráfico sigmoidal de dose-resposta (B). Os valores inferior e superior são 0,000 e 8,727, respectivamente, com erro padrão 0,412 e 0,232, respectivamente.

Os efeitos da toxicidade do arsênio e do cromo em animais aquáticos dependem de condições abióticas e interações bióticas. As condições bióticas

envolvem o tipo de espécie, idade e estágio de desenvolvimento. A capacidade de acumulação de arsênio em animais aquáticos é modulada pela condição abiótica da salinidade. O estresse oxidativo resultante da exposição a As e Cr é gerado por um desequilíbrio entre a homeostase pró-oxidante e antioxidante (VELMA; VUTUKURU; TCHOUNWOU, 2009; VENTURA-LIMA; BOGO; MONSERRAT, 2011).

Em um estudo em neonatos com *Daphnia magna* expostos ao Cr (VI), as atividades da enzima antioxidante, de todos os grupos testados, apresentaram aumento na atividade. Em comparação aos grupos controle, a atividade antioxidante enzimática foi estatisticamente diferente nos grupos expostos ao cromo. A exposição ao cromo induziu a ativação da enzima catalase (CAT) em neonatos, e a atividade da glutaciona peroxidase (GPx) dos neonatos aumentou com a concentração de cromo. O aumento da atividade de CAT implica na formação de peróxido de hidrogênio celular, que é reduzido através de reações do tipo Fenton até obter estados de oxidação menos ativos ou tóxicos. Outros peróxidos produzidos por esse processo podem ser neutralizados pela participação da GPx. A ativação do sistema antioxidante em neonatos para neutralizar espécies pró-oxidantes produzidas por exposição a substâncias tóxicas, prevenindo danos oxidativos, é um processo que demanda muita energia, podendo significar uma redução em sua taxa de crescimento e atraso atingindo a maturidade (ARZATE-CÁRDENAS; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, 2011).

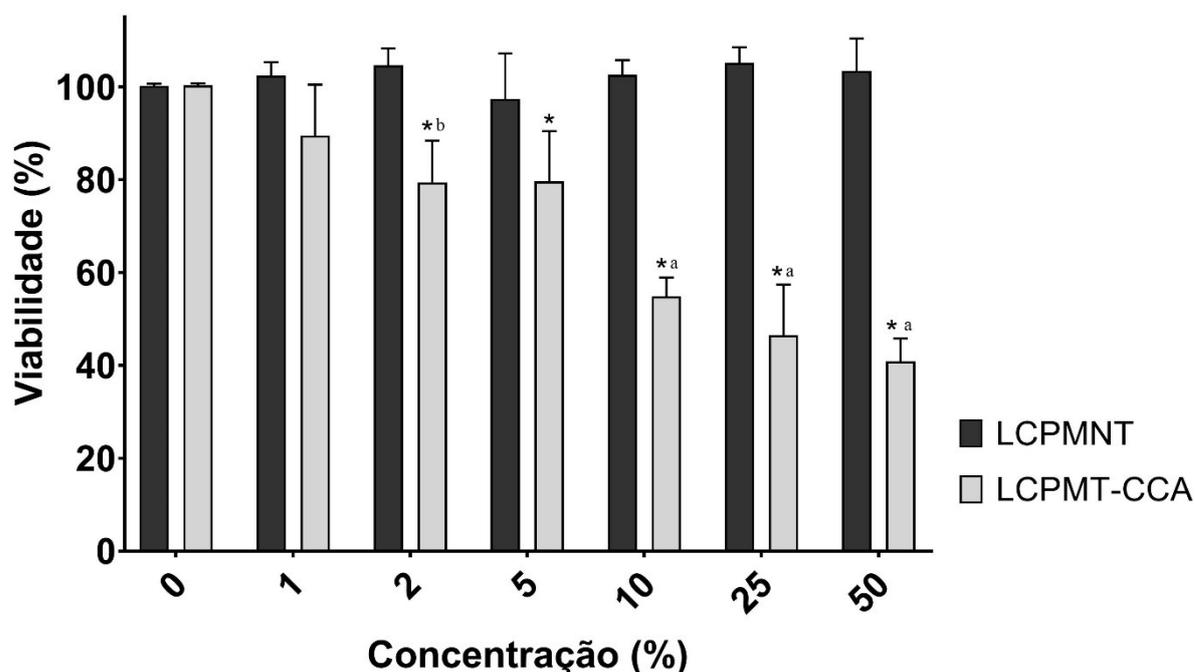
Com base nos descritos acima, há probabilidade de que o mesmo mecanismo ocorra em neonatos de *Artemia spp* expostos ao LCPMT-CCA, por se tratar de um microcrustáceo semelhante, de mesmo ecossistema aquático e também utilizado como bioindicador.

4.2.4 Teste de citotoxicidade *in vitro*

A citotoxicidade dos lixiviados foi avaliada nas células NIH3T3. Como pode ser observado na Figura 14, o LCPMNT não causou efeitos citotóxicos significativos nas células NIH3T3 em todas as concentrações testadas. Por outro lado, o LCPMT-CCA apresentou uma diminuição significativa na viabilidade celular quando comparado ao grupo controle nas concentrações de 2, 5, 10, 25 e 50%. A concentração de 1% foi a única que não apresentou efeitos citotóxicos significativos quando comparada ao grupo controle. Estes resultados mostraram que o LCPMT-

CCA foi mais citotóxico para as células NIH3T3 do que o LCPMNT em concentrações superiores a 5%. Além disso, esses resultados corroboram com os ensaios ecotoxicológicos apresentados nas Figuras 11, 12 e 13.

Figura 14 - Citotoxicidade *in vitro* de lixiviados LCPMNT e LCPMT- CCA nas células NIH3T3



As barras indicam a média \pm DP de quatro ensaios ($n_{\text{total}} = 12$) *Estatisticamente significativo comparado ao grupo controle ($p < 0,05$; ANOVA de duas vias. Teste *post hoc* de Bonferroni). ^aEstatisticamente significativo comparado entre os grupos LCPMNT e LCPMT-CCA na mesma concentração ($p < 0,0001$; ANOVA de duas vias. Teste *post hoc* de Bonferroni).). ^bEstatisticamente significativo comparado entre LCPMNT e LCPMT-CCA, ambos na mesma concentração ($p < 0,003$; ANOVA de duas vias. Teste *post hoc* de Bonferroni).

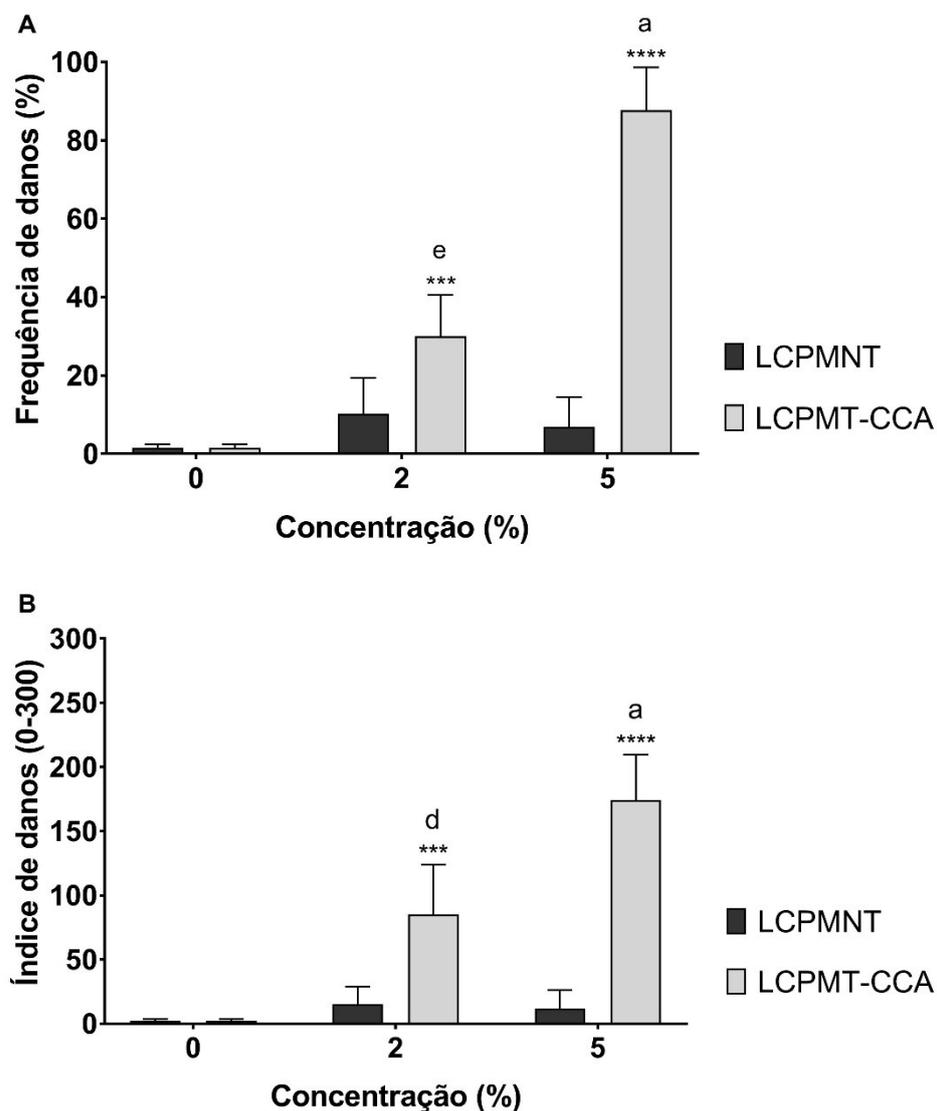
4.3 TESTES GENOTOXICOLÓGICOS

4.3.1 Ensaio cometa

No ensaio cometa, o LCPMNT não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle nas concentrações testadas (2, 5 e 10%). No entanto, nas concentrações de 2 e 5%, o LCPMT-CCA apresentou aumento estatisticamente significativo da frequência de danos e do índice de danos quando comparado ao grupo controle e quando comparado ao LCPMNT nas mesmas concentrações (Figura 15A e Figura 15B). Na concentração de 10% de LCPMT-CCA, a quantificação não foi possível devido à baixa viabilidade celular

resultante, e houve indicações de mecanismos de morte celular como apoptose e necrose. Esses resultados corroboram os obtidos no ensaio de citotoxicidade *in vitro* (ensaio MTT), em que 10% do LCPMT-CCA apresentavam uma viabilidade média de 50%.

Figura 15 - Efeitos dos lixiviados LCPMNT e LCPMT-CCA na frequência e no índice de danos ao DNA de células NIH3T3



As barras indicam a média \pm DP de um experimento ($n_{\text{total}} = 72$ lâminas, aproximadamente 360 células) em termos de frequência de dano (A) e índice de dano (B). ***Estatisticamente significativo comparado ao grupo controle ($p < 0,0002$; ANOVA de duas vias. Teste *post hoc* de Bonferroni). ****Estatisticamente significativo comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$; ANOVA de duas vias. Teste *post hoc* de Bonferroni). ^aEstatisticamente significativo comparado entre os grupos LCPMNT e LCPMT-CCA na mesma concentração ($p < 0,0001$; ANOVA de duas vias. Teste *post hoc* de Bonferroni). ^dEstatisticamente significativo comparado entre os grupos LCPMNT e LCPMT-CCA na mesma concentração ($p < 0,0002$; ANOVA de duas vias. Teste *post hoc* de Bonferroni). ^eEstatisticamente significativo comparado entre os grupos LCPMNT e LCPMT-CCA na mesma concentração ($p < 0,004$; ANOVA de duas vias. Teste *post hoc* de Bonferroni).

Os níveis de cromo e arsênico nas amostras de lixiviados e cinzas da madeira tratada com CCA, que não foram encontrados nos lixiviados e cinzas de amostras de madeira não tratada, são potenciais promotores de danos no DNA e de citotoxicidade.

Ohgami et al (2015) avaliaram detritos de madeira coletados após o tsunami em 2011 no Japão, verificando os efeitos da co-exposição ao Cr, Cu e As em atividades nas células das linhas BEAS-2B e A549. Os resultados sugeriram risco carcinogênico por co-exposição a Cr e As no processo de incineração de detritos, incluindo madeira tratada com CCA (OHGAMI et al., 2015).

Os efeitos tóxicos pela exposição ao As são desencadeados por conversões metabólicas. Os As e seus metabólitos interagem com macromoléculas. Essas interações promovem inibição da respiração mitocondrial, implicando na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem evoluir para danos e mutações no DNA, posteriormente ao desenvolvimento do câncer e à morte celular (MOLIN et al., 2015).

Os efeitos sinérgicos dos metabólitos do arsênico e as interações da especiação com cromo no metabolismo podem promover a inibição da respiração mitocondrial, levando à morte celular. Isso se confirma nos resultados de citotoxicidade pelo ensaio MTT, porque o ensaio é dependente da respiração mitocondrial e serve para avaliar a viabilidade de uma célula, de modo indireto a morte celular. A determinação da viabilidade celular através da atividade mitocondrial baseia-se na quantificação diretamente proporcional da redução do MTT, um sal de cor amarela solúvel em água em formazan, um sal de cor roxa insolúvel em água (MOSMANN, 1983).

Os grupos fosfato podem ser substituídos estruturalmente por alguns compostos de arsênico, desestabilizando enzimas dependendo desse grupo para sua atividade, como um exemplo, dificultando a síntese de Adenosina Trifosfato (ATP) e DNA (MOLIN et al., 2015). E também As (III) inativa enzimas ao interagir com os grupos sulfidril de proteínas e afeta a função mitocondrial ao obstruir a atividade da succinato desidrogenase e desacoplar a fosforilação oxidativa (CHOU et al., 2007). Portanto, é possível que o arsênio concorra com os grupos fosfato no processo de fosforilação oxidativa e possa inibir a produção de energia. Alguma especiação de As, As (III) e As (V) pode levar à morte em doses agudas e tem sido

associada a efeitos na saúde, como no pulmão, bexiga, câncer de rim e pele, neurotoxicidade e dano ao DNA (CHOU et al., 2007; MOLIN et al., 2015).

O teor de cromo nas cinzas resultante da combustão da madeira tratada com CCA e do lixiviado a partir desta é frequentemente oxidado em cromo hexavalente, Cr (VI), uma forma mais tóxica e com maior mobilidade (DECKER et al., 2002; WASSON et al., 2005; JAMBECK et al., 2007). O Cr (VI) passa rapidamente pelas membranas celulares e pode entrar na célula via canal de ânion sulfato, devido à sua similaridade estrutural química com o sulfato (BLASIAK; KOWALIK, 2000; VITI et al., 2014), e depois reduz a espécies trivalentes estáveis, devido a várias atividades enzimáticas e não enzimáticas, que se combina com numerosas macromoléculas, incluindo material genético, levando a efeitos tóxicos mutagênicos. Assim, a toxicidade e a atividade mutagênica são desencadeadas pela fácil permeabilidade e propriedade de bio-transformação do cromo hexavalente (BAKSHI; PANIGRAHI, 2018).

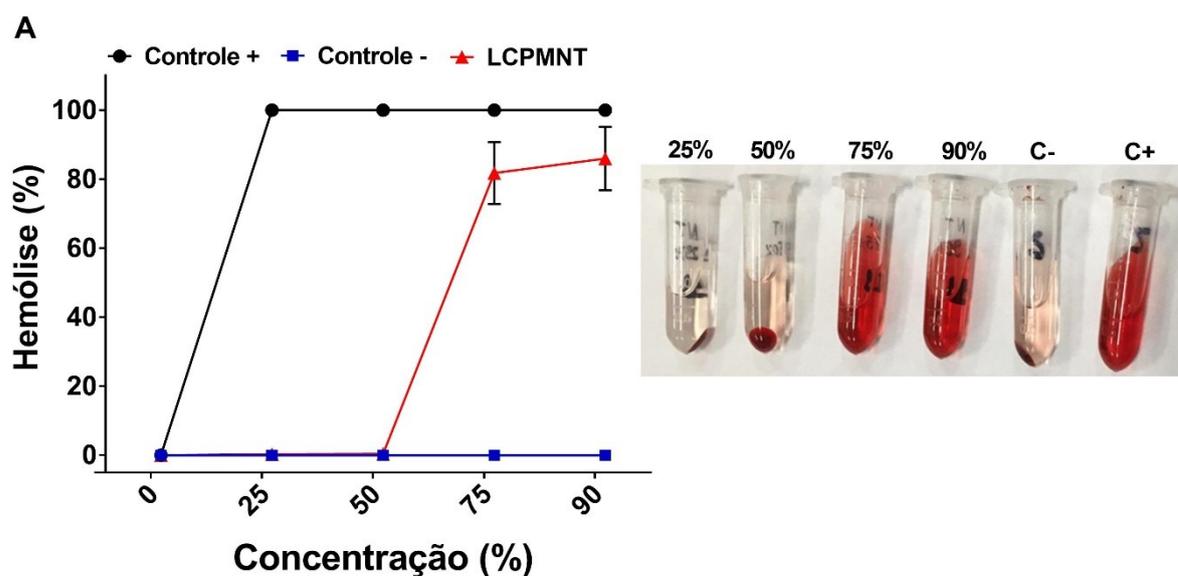
A absorção de arsênico durante a coexposição de arsênico e cromo na pele e no trato gastrointestinal foi maior do que na mesma dose na exposição única desse metalóide (CHOU et al., 2007). Avaliando a nefrotoxicidade, um efeito sinérgico entre o arsênico pentavalente e o cromo hexavalente foi detectado pelo maior acúmulo de cromo e arsênico no mesmo órgão em animais expostos ao CCA do que em animais expostos a óxidos isolados de arsênio pentavalente e cromo hexavalente (MATOS et al., 2009). A partir da determinação *in vitro* por análise de imunotransferência, os níveis fosforilados de uma via de sinalização intracelular, com co-exposição a Cr e As, foram significativamente maiores do que aqueles com exposição única a Cr ou As (OHGAMI et al., 2015). O arsênico e o cromo têm propriedades oxidantes, o que pode indicar o potencial de ação sinérgica (CHOU et al., 2007).

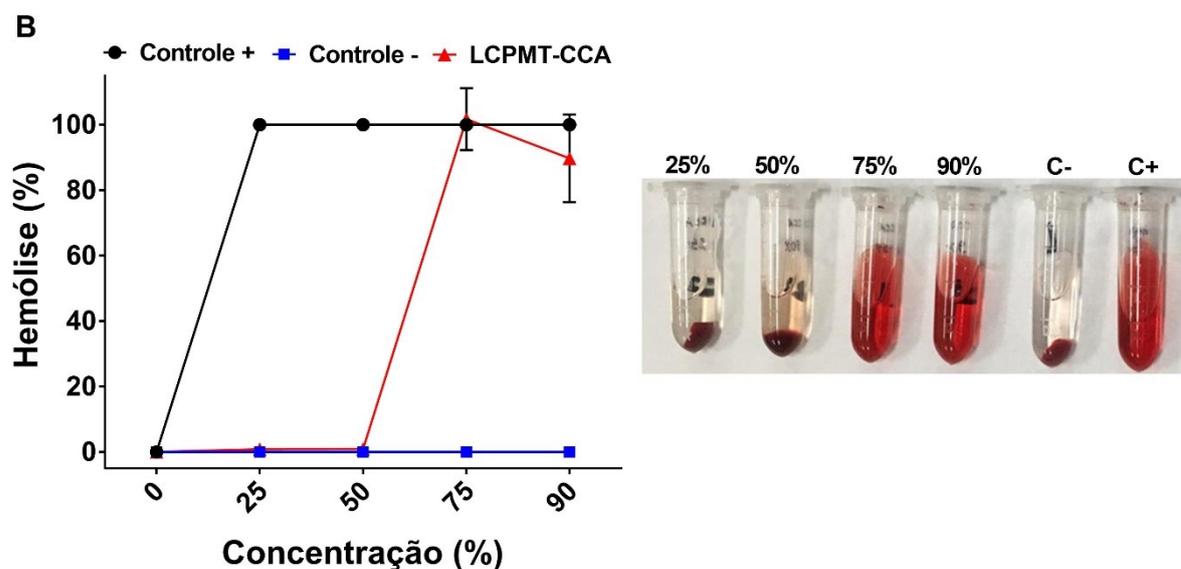
O potencial de ação sinérgica entre os componentes de CCA evidencia um elevado potencial tóxico das cinzas de madeira tratada com CCA e de seu lixiviado resultante, LCPMT-CCA. Este potencial foi enfatizado pelos efeitos desencadeados nos diversos modelos experimentais utilizados neste trabalho e dos efeitos genotóxicos verificados pelo ensaio cometa e dos efeitos ecotoxicológicos muito provavelmente de mecanismos relacionados ao estresse oxidativo e danos ao DNA.

4.4 ENSAIO DE HEMÓLISE *EX VIVO*

O ensaio de hemólise é um teste importante para avaliar o potencial hemolítico *ex vivo* de LCPMT-CCA e LCPMNT em eritrócitos humanos. De acordo com o critério do método de teste padrão para análise das propriedades hemolíticas das nanopartículas (ASTM E2524 08), uma porcentagem de hemólise > 5% indica que o material de teste causa danos (FEUSER et al., 2016). Como pode ser observado na Figura 16, os lixiviados LCPMT-CCA e LCPMNT apresentaram dano hemolítico nas concentrações de 75 e 90%. Nas concentrações mais baixas, 25 e 50%, os lixiviados não causaram danos aos eritrócitos humanos (<5% de taxa de hemólise).

Figura 16 - Ensaio de hemólise em eritrócitos humanos incubados por 2h com lixiviados LCPMNT (A) e LCPMT-CCA (B) em diferentes concentrações





Os dados representam média \pm DP ($n = 3$). C - (controle negativo - apenas água destilada) e C + (controle positivo - apenas solução salina).

Além de validar o ensaio de hemólise, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo para avaliar possíveis alterações morfológicas dos eritrócitos. Essa técnica pode ser útil para definir melhor anormalidades reológicas em muitos estados de doença a partir de alterações morfológicas dos eritrócitos (AHLGRIM et al., 2013; PIAGNERELLI et al., 2007). Os eritrócitos apresentaram distribuição bimodal (controle negativo), característica de células saudáveis, como pode ser visto na Figura 17 e Figura 18 (PIAGNERELLI et al., 2007; ROLFES-CURI et al., 1991).

Figura 17 - Avaliação de hemólise dos eritrócitos humanos incubados por 2h com lixiviados LCPMNT por citometria de fluxo

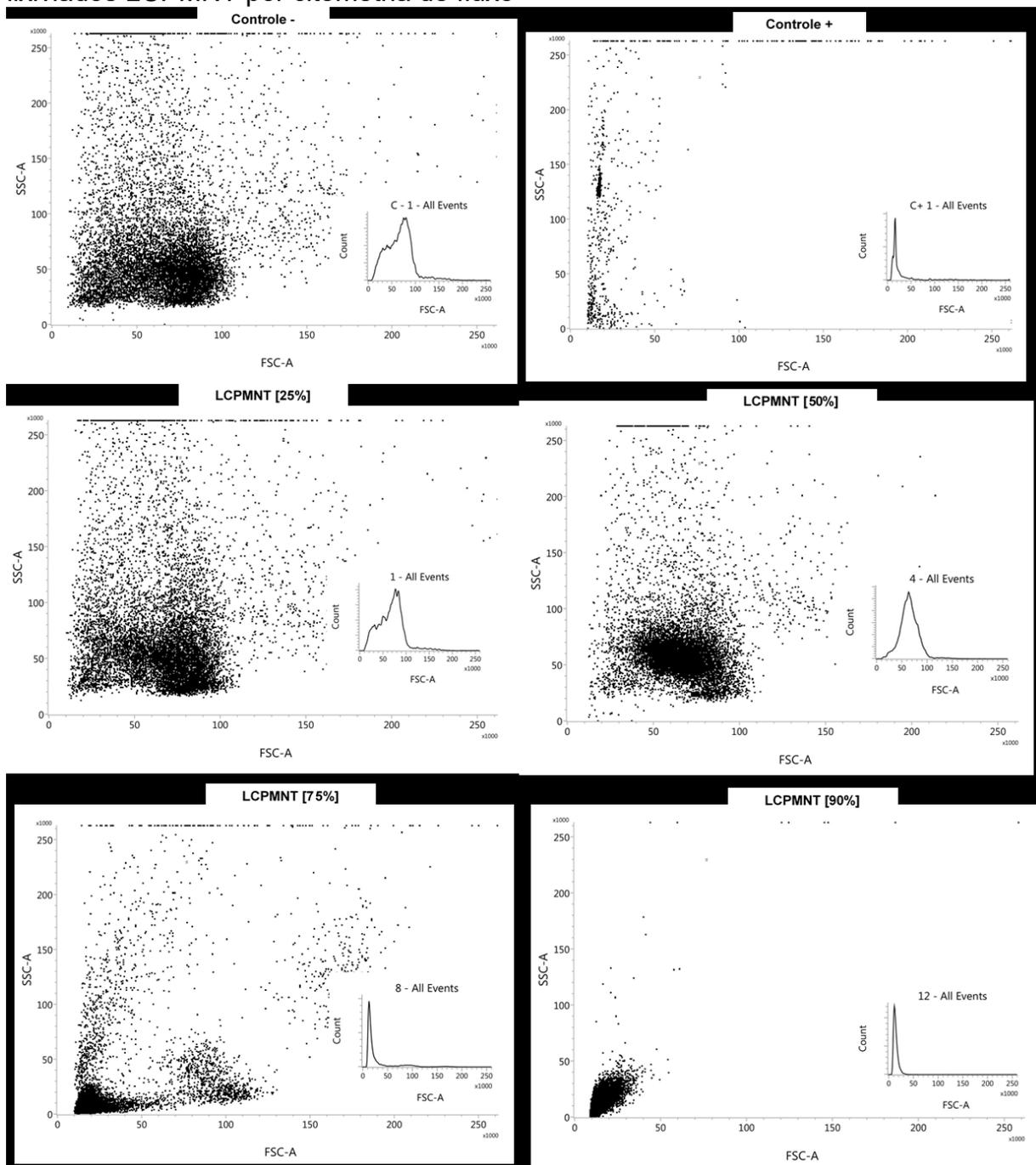
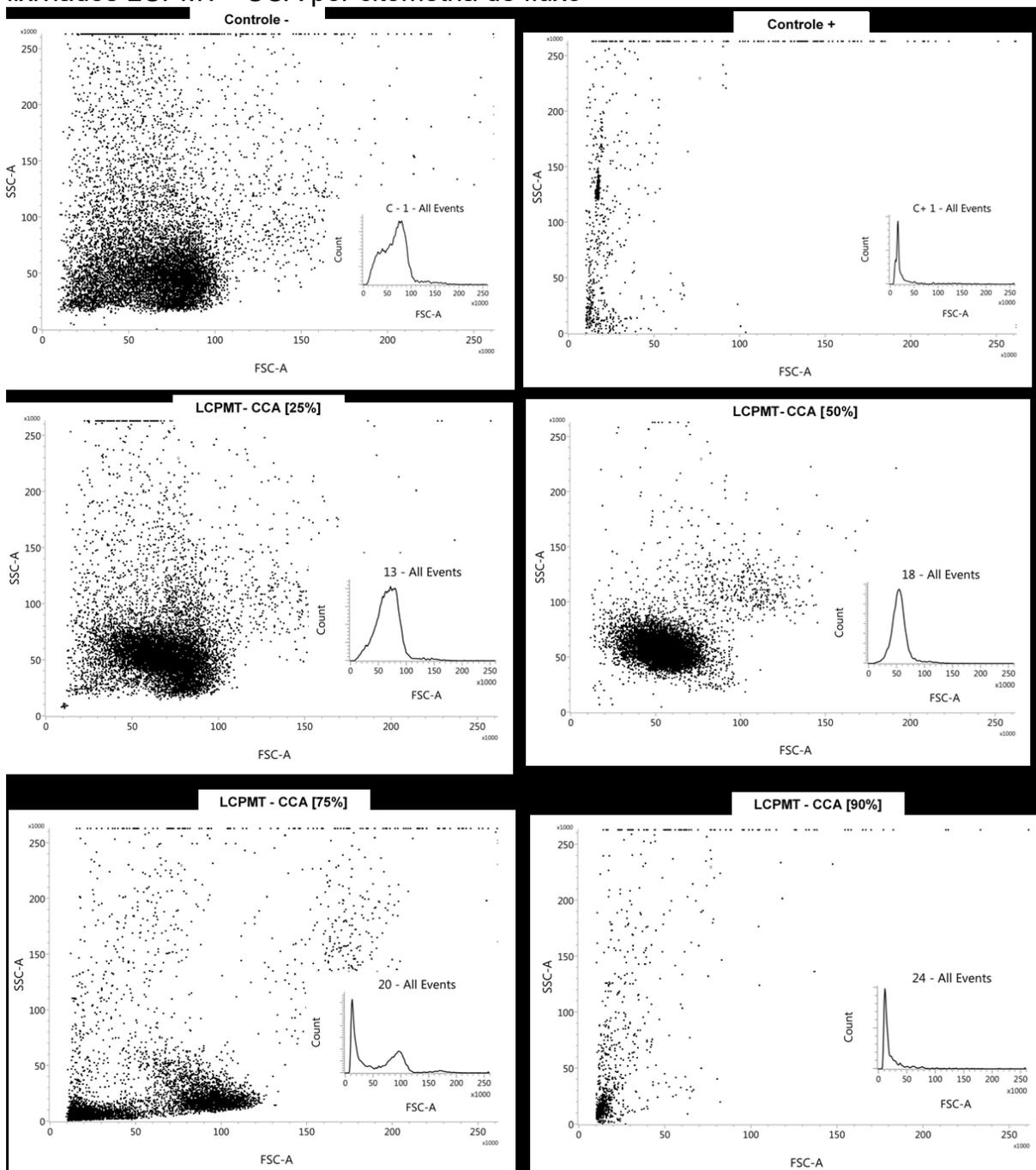


Figura 18 - Avaliação de hemólise dos eritrócitos humanos incubados por 2h com lixiviados LCPMT - CCA por citometria de fluxo



Como mostrado nos ensaios de hemólise, ambos os lixiviados LCPMT-CCA e LCPMNT apresentaram apenas danos aos eritrócitos nas concentrações de 75 e 90%. No entanto, a técnica de citometria de fluxo mostrou que apenas LCPMNT na concentração de 25% apresentou eritrócitos com distribuição bimodal. Na concentração de 50% já foi observada uma distribuição monomodal para o lixiviado LCPMNT, sugerindo uma alteração morfológica dos eritrócitos. Em concentrações mais altas (75 e 90%), o dano hemolítico foi semelhante ao controle

positivo, danificando quase totalmente os eritrócitos. Por outro lado, o LCPMT-CCA apresentou alteração morfológica na menor concentração quando comparado ao controle negativo. Na concentração de 50% foi observada maior alteração morfológica nos eritrócitos. Nas concentrações mais altas, o dano foi semelhante ao LCPMNT. Portanto, a partir de ensaios por citômetro de fluxo do lixiviado LCPMT-CCA foi mais prejudicial aos eritrócitos que o LCPMNT e ambos os lixiviados em altas concentrações podem causar sérios danos aos eritrócitos. Com base nos resultados de hemólise *in vitro* e por citometria, o LCPMNT pode causar danos ao DNA, possivelmente estresse oxidativo descendente, o que corrobora com as propriedades genotóxicas dos compostos de arsênio e cromo.

Os resultados obtidos durante os ensaios ecotoxicológicos, MTT, cometa e, finalmente, hemólise sugerem que o teor de arsênio e cromo do lixiviado desempenha um papel importante nos efeitos ecotóxicos, tóxicos e genotóxicos provocados pelo LCPMT-CCA. Além disso, os LCPMNT não apresentam danos ao DNA ou citotoxicidade *in vitro*, e apresentaram efeitos subtóxicos baixos em modelos ecotoxicológicos.

5 CONCLUSÃO

Por meio dos diversos ensaios, foi realizada a avaliação do potencial tóxico de LCPMT-CCA e LCPMNT. Verificou-se que o LCPMT-CCA pode causar toxicidade significativa a organismos microcrustáceos, plantas superiores, células de mamíferos e eritrócitos humanos, com efeitos agudos e subcrônicos e efeitos genotóxicos. Há evidências de que o LCPMT-CCA inibe o crescimento radicular e ganho de biomassa de *A. cepa* e *L. sativa*, sendo fitotóxico, mesmo em concentrações mais baixas, como 25%. Também causa a morte de indivíduos *Artemia spp.* à medida que sua concentração aumenta, podendo, com baixa concentração, 24,62%, causar a morte de aproximadamente 50% dos indivíduos. Nos resultados do ensaio MTT e do cometa, cujas células da linhagem NIH3T3 apresentaram alto dano ao DNA e inviabilidade das células, quando expostas a concentrações relativamente baixas de lixiviado LCPMT-CCA, indicando que este lixiviado causa morte celular e danos ao DNA, o que pode progredir para doenças e complicações no sistema celular. Esses efeitos foram verificados mesmo em baixas concentrações, enquanto o LCPMNT não demonstrou tais efeitos.

Portanto, o LCPMT-CCA, se liberado no ambiente, pode desencadear um impacto deletério na biota. Este estudo, confrontado com a literatura, demonstra que o possível mecanismo de toxicidade desencadeado pelo lixiviado LCPMT-CCA envolve estresse oxidativo, dano ao DNA, promovido pela metabolização dos compostos do CCA, As e Cr. Desta forma, integraram-se as relações concentração-resposta por dados químicos e análises toxicológicas. Esta integração está baseada nas concentrações consideráveis de Cr e As, contidas nas cinzas de fundo e lixiviados e seus respectivos os efeitos constatados nos resultados deste trabalho, que são confirmados pela literatura (ALAM et al., 2019; ARZATE-CÁRDENAS; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, 2011; BAKSHI; PANIGRAHI, 2018; BLASIAK; KOWALIK, 2000; CHOU et al., 2007; MATOS et al., 2009; MOLIN et al., 2015; MOLLON et al., 2016; OHGAMI et al., 2015; PATRA; PRADHAN; PATRA, 2018; RAMÍREZ-DÍAZ et al., 2008; VITI et al., 2014) em modelos experimentais semelhantes e outros, expostos a esses compostos.

Cabe ressaltar que os resultados deste trabalho aliados aos resultados da literatura, estabelecem subsídios para que gestores públicos possam desenvolver normativas quanto à restrição de usos domésticos de madeira tratada com CCA,

especialmente para combustão, considerando os efeitos tóxicos à saúde humana e ao meio ambiente. Há necessidade da regulamentação e normalização principalmente no âmbito do uso energético da madeira tratada com CCA, visto de seus elevados impactos à saúde humana e ao meio ambiente, devido as emissões atmosféricas de gases e particulados e de suas cinzas residuais.

6 PERSPECTIVAS

Sugere-se para futuros trabalhos no âmbito do estudo realizado, o aprimoramento das técnicas de investigação por meio da realização de ensaios para verificação de estresse oxidativo. Indicam-se estudos que envolvam a análises de enzimas antioxidantes como peroxidase, catalase e super óxido dismutase (SOD), pois estes fazem parte do sistema de defesa antioxidante e indiretamente indicam danos oxidativos. Igualmente indica-se a análise de peroxidação lipídica, pela determinação, por exemplo, de malondialdeído (MDA), um indicador da mesma, além de avaliação do acúmulo de espécies reativas de oxigênio. A integração destes parâmetros terá o intuito de confirmar o mecanismo fisiopatológico que culmina no desencadeamento dos efeitos tóxicos demonstrados e avaliados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABNT. ABNT NBR 10005:2004 Procedimento para obtenção de extrato lixiviado de resíduos sólidos. p. 16, 2004.
- AHLGRIM, C. et al. Flow Cytometric Assessment of Erythrocyte Shape through Analysis of FSC Histograms: Use of Kurtosis and Implications for Longitudinal Evaluation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–6, 2013.
- ALAM, M. Z. et al. Arsenic accumulation in lentil (*Lens culinaris*) genotypes and risk associated with the consumption of grains. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd ed. **American Public Health Association, Washington, DC, USA**, 2012.
- ARCH WOOD PROTECTION. Pressure-Treated. v. WOL 849, 2004.
- ARZATE-CÁRDENAS, M. A.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F. Age-altered susceptibility in hexavalent chromium-exposed *Daphnia schodleri* (Anomopoda: Daphniidae): Integrated Biomarker Response implementation. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3–4, p. 528–534, 2011.
- AWPA. AWPA P5: Standard for waterborne preservatives. v. P5-91, n. i, p. 4, 1991.
- AZEVEDO, F. A. DE; LIMA, I. V. DE. Toxicocinética. In: **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003. p. 27–91.
- BAKSHI, A.; PANIGRAHI, A. K. A comprehensive review on chromium induced alterations in fresh water fishes. **Toxicology Reports**, v. 5, n. March, p. 440–447, 2018.
- BLASIAK, J.; KOWALIK, J. A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 469, n. 1, p. 135–145, 2000.
- BORTOLOTTO, T. et al. Evaluation of the toxic and genotoxic potential of landfill leachates using bioassays. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 2, p. 288–293, 2009.
- BORTOLOTTO, T. et al. Evaluation of toxic and genotoxic potential of a wet gas scrubber effluent obtained from wooden-based biomass furnaces: A case study in the red ceramic industry in southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 143, n. May, p. 259–265, 2017.
- BRITO, J. O. Uso Energético Da Madeira. **ESTUDOS AVANÇADOS**, v. 21, n. 59, p. 185–193, 2007.

CAPANEMA, D. C. DE O. et al. Setor Madeireiro e as Consequências do Uso da Madeira na Construção Civil: Possíveis Soluções. p. 335–347, 2013.

CHOU, S. et al. Chemical-specific health consultation for chromated copper arsenate chemical mixture: Port of Djibouti. **Toxicology and Industrial Health**, v. 23, n. 4, p. 183–208, 2007.

CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically**. 11 th ed. Wayne, PA, USA: M07, 2018.

COLLINS, A. et al. Comet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation, and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 30, n. 2, p. 139–146, 1997.

COLODETTE, J. L. et al. The Brazilian wood biomass supply and utilization focusing on eucalypt. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1–8, 2014.

DAGAN, R.; BITTON, G.; TOWNSEND, T. G. Metal transport and bioavailability in soil contaminated with CCA-treated wood leachates. **Soil and Sediment Contamination**, v. 15, n. 1, p. 61–72, 2006.

DANIELSEN, P. H. et al. Oxidative damage to DNA and repair induced by Norwegian wood smoke particles in human A549 and THP-1 cell lines. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1–2, p. 116–122, 2009.

DECKER, P. et al. Exposure to Wood Dust and Heavy Metals in Workers Using CCA. **AIHA Journal**, v. 63, n. 2, p. 166–171, 2002.

FERNICOLA, N. A. G. G. DE; BOHRER-MOREL, M. B. C.; BAINY, A. C. D. Ecotoxicologia. In: **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003. p. 221–243.

FEUSER, P. E. et al. Increased cellular uptake of lauryl gallate loaded in superparamagnetic poly(methyl methacrylate) nanoparticles due to surface modification with folic acid. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 27, n. 12, 2016.

FONTES, A. A. **A CADEIA PRODUTIVA DA MADEIRA PARA ENERGIA**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2005.

GHOSH, S. et al. Evaluating the morphology of erythrocyte population : An approach based on atomic force microscopy and flow cytometry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1858, p. 671–681, 2016.

GIODA, A. Residential fuelwood consumption in Brazil: Environmental and social implications. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, n. October 2018, p. 367–375, 2019.

GOES, R. C. **Toxicologia industrial: um guia prático para prevenção e primeiros socorros.** [s.l.] Revinter, 1998.

GOLDEMBERG, J. Energia, Meio Ambiente & Desenvolvimento. **São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo**, 2001.

GRAPHPAD; SOFTWARE. Sigmoidal dose-response equation. In: **GraphPad Curve Fitting Guide.** [s.l.: s.n.].

GUPTA, P. General toxicology. In: **Illustrated Toxicology.** [s.l.] Elsevier, 2018. p. 1–65.

GUPTA, P. K. Principles and basic concepts of toxicokinetics. In: **Fundamentals of Toxicology: Essential Concepts and Applications.** [s.l.] Elsevier Inc., 2016. p. 87–107.

HATA, T. et al. Electron microscopic study on pyrolysis of CCA (chromium, copper and arsenic oxide)-treated wood. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 68–69, p. 635–643, 2003.

HAZARDOUS SUBSTANCES DATA BANK (HSDB). **COPPER(II) OXIDE** National Library of Medicine's, , 2001. Disponível em: <<http://toxnet.nlm.nih.gov>>

HELSEN, L.; HACALA, A. Formation of metal agglomerates during carbonisation of chromated copper arsenate (CCA) treated wood waste: Comparison between a lab scale and an industrial plant. **Journal of Hazardous Materials B**, v. 137, n. 3, p. 1438–1452, 2006.

HILDEBRANDT, J.; HAGEMANN, N.; THRÄN, D. The contribution of wood-based construction materials for leveraging a low carbon building sector in europe. **Sustainable Cities and Society**, v. 34, n. July, p. 405–418, 2017.

HINRICHS, R.; KLEINBACH, M. H.; REIS, L. B. DOS. **Energia e meio ambiente.** São Paulo: Cengage Learning, 2015.

IBGE, I. B. DE G. E. E.-. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura.** Rio de Janeiro: [s.n.]. v. 31

JAMBECK, J. et al. CCA-Treated wood disposed in landfills and life-cycle trade-offs with waste-to-energy and MSW landfill disposal. **Waste Management**, v. 27, n. 8, p. 21–28, 2007.

LUO, H. et al. Review of leaching behavior of municipal solid waste incineration (MSWI) ash. **Science of the Total Environment**, v. 668, p. 90–103, 2019.

MARTINEZ, C. L. M. et al. Bioenergy Technology Solutions in Brazil. **Revista Ciência da Madeira - RCM**, v. 10, n. 2, p. 112–122, 2019.

MATOS, R. C. et al. Nephrotoxicity effects of the wood preservative chromium copper arsenate on mice: Histopathological and quantitative approaches. **Journal of**

Trace Elements in Medicine and Biology, v. 23, n. 3, p. 224–230, 2009.

MOLIN, M. et al. Arsenic in the human food chain, biotransformation and toxicology - Review focusing on seafood arsenic. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 31, p. 249–259, 2015.

MOLLON, L. C. et al. Mobility and toxicity of heavy metal(loid)s arising from contaminated wood ash application to a pasture grassland soil. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 419–427, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, 1983.

NETTO, E. et al. Evaluation of the toxic and genotoxic potential of acid mine drainage using physicochemical parameters and bioassays. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 511–516, 2013.

OGA, S.; ZANINI, A. C. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

OHGAMI, N. et al. Carcinogenic risk of chromium, copper and arsenic in CCA-treated wood. **Environmental Pollution**, v. 206, p. 456–460, 2015.

PAOLIELLO, M. M. B.; SILVA, E. S. DA. Toxicodinâmica. In: **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003. p. 93–114.

PASSAGLI, M. **Toxicologia Forense: teoria e prática**. 4. ed. [s.l.] Millennium, 2013.

PATRA, D. K.; PRADHAN, C.; PATRA, H. K. An in situ study of growth of Lemongrass *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) W. Watson on varying concentration of Chromium (Cr+6) on soil and its bioaccumulation: Perspectives on phytoremediation potential and phytostabilisation of chromium toxicity. **Chemosphere**, v. 193, p. 793–799, 2018.

PEDERSEN, A. J.; OTTOSEN, L. M. Elemental analysis of ash residue from combustion of CCA treated wood waste before and after electro-dialytic extraction. **Chemosphere**, v. 65, n. 1, p. 110–116, 2006.

PEDROZO, M. DE F. M. Toxicovigilância (monitorização) da exposição de populações a agentes tóxicos. In: **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003. p. 167–220.

PIAGNERELLI, M. et al. Assessment of erythrocyte shape by flow cytometry techniques. **Journal of Clinical Pathology**, v. 60, n. 5, p. 549–554, 2007.

POLJSAK, B. et al. Interference of chromium with biological systems in yeasts and fungi: A review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 21–36, 2010.

RAMÍREZ-DÍAZ, M. I. et al. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. **BioMetals**, v. 21, n. 3, p. 321–332, 2008.

RAPOSO, P. C. et al. Mechanical properties of wood construction materials from a building from the 19th century. **Procedia Structural Integrity**, v. 5, p. 1097–1101, 2017.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese Ambiental. Editora **ULBRA**, 2003.

ROLFES-CURI, A. et al. Flow cytometric analysis of human erythrocytes: possible identification of senescent rbc with fluorescently labelled wheat germ agglutinin. **Experimental Gerontology**, v. 26, n. December 1990, p. 327–345, 1991.

RUPPENTHAL, J. E. **Toxicologia**. [s.l: s.n.].

SACHS, I. A revolução energética do século XXI. **Estudos Avançados**, v. 21, n. 59, p. 21–38, 2007.

SHIAU, R. J.; SMITH, R. L.; AVELLAR, B. Effects of steam explosion processing and organic acids on CCA removal from treated wood waste. **Wood Science and Technology**, v. 34, n. 5, p. 377–388, 2000.

SILVA, J. DA; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SINDIMADE. **História da Indústria da Madeira**. Disponível em: <<http://www.sindimade.net.br/index.php/o-setor>>.

SINGH, N. et al. A Simple Technique for Quantitation Damage in Individual of Low Levels of DNA Cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184–191, 1988.

SMITH, K. R. Health impacts of household fuelwood use in developing countries. **Unasyuva**, 2006.

SOLO-GABRIELE, H. M. et al. Characteristics of chromated copper arsenate-treated wood ash. **Journal of Hazardous Materials**, v. B89, p. 213–232, 2002.

STIERNSTRÖM, S. et al. An ecotoxicological approach for hazard identification of energy ash. **Waste Management**, v. 31, n. 2, p. 342–352, 2011.

TICE, R. R. et al. Single Cell Gel / Comet Assay : Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–221, 2000.

VELMA, V.; VUTUKURU, S. S.; TCHOUNWOU, P. B. Ecotoxicology of hexavalent chromium in freshwater fish: A critical review. **Reviews on Environmental Health**, v. 24, n. 2, p. 129–145, 2009.

VENTURA-LIMA, J.; BOGO, M. R.; MONSERRAT, J. M. Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: A comparative biochemical approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 3, p. 211–218, 2011.

VIDAL, J. M. et al. PRESERVAÇÃO DE MADEIRAS NO BRASIL: HISTÓRICO, CENÁRIO ATUAL E TENDÊNCIAS. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 1, p. 257–271, 2015.

VITI, C. et al. Molecular mechanisms of Cr(VI) resistance in bacteria and fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 4, p. 633–659, 2014.

WASSON, S. J. et al. Emissions of chromium, copper, arsenic, and PCDDs/Fs from open burning of CCA-treated wood. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 22, p. 8865–8876, 2005.

YAMAMOTO, A. et al. Flow Cytometric Analysis of Red Blood Cell Osmotic Fragility. n. Mcv, 2014.

YU, T.; MALUGIN, A.; GHANDEHARI, H. Impact of Silica Nanoparticle Design on Cellular Toxicity and Hemolytic Activity. **ACS Nano**, v. 5, n. 7, p. 5717–5728, 2011.