



## **Avaliação preliminar da contaminação da água por pireno, formação de derivados clorados durante o processo de cloração e toxicidade em células HepG2**

*Preliminary evaluation of water contamination by pyrene, formation of chlorinate derivatives during water disinfection and toxicity in HepG2 cells*

Silvia José, Patricia I. Morgado, Luísa Jordão

[maria.jordao@insa.min-saude.pt](mailto:maria.jordao@insa.min-saude.pt)

Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

### **\_Resumo**

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são um grupo de contaminantes ambientais, classificados como potencialmente tóxicos, mutagénicos e carcinogénicos, constituindo um problema de saúde pública. No presente estudo, a presença de pireno (Pyr) e 1-cloro-pireno (1-CIPyr) e, diferentes amostras de água (água superficial, subterrânea e água da rede) foi pesquisada por cromatografia gasosa - espectrometria de massa (GC-MS) após concentração da amostra por micro extração em fase sólida. Usando água com diferentes concentrações de Pyr, mostramos que uma concentração mínima deste composto é necessária para que o 1-CIPyr se forme durante o processo de cloração. Finalmente, avaliamos a toxicidade induzida por 1-CIPyr em células HepG2. Os resultados mostraram que este composto é tóxico e afeta a polarização da membrana mitocondrial.

### **\_Abstract**

*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are a group of environmental contaminants, classified as potentially toxic, mutagenic and carcinogenic, being an important public health concern. In the present study, we assayed different samples of water (superficial water, groundwater and tap water) for pyrene (Pyr) and 1-chloro-pyrene (1-CIPyr) by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) after sample concentration by solid phase microextraction. Using water with different Pyr concentrations, we showed that a minimal concentration of pyrene in water undergoing chlorination is required for 1-CIPyr formation. Finally, we evaluated the toxicity induced by 1-CIPyr in human hepatocarcinoma cells (HepG2). The results showed that this compound is toxic and affects mitochondrial membrane polarization.*

### **\_Introdução**

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são um grupo de poluentes orgânicos persistentes, formados por dois ou mais anéis de benzeno fundidos. Estes compostos estão amplamente distribuídos no ambiente, representando uma preocupação ecológica e de saúde pública. Os PAHs são formados por processos naturais (incêndios florestais, erupções vulcânicas, etc.) e antropogénicos (queima de combustíveis fósseis e madeira, produção de carvão vegetal, indústria petrolífera, derrames de petróleo, etc.) (1-6) e podem mover-se entre compartimentos ambientais (7,8). O desaparecimento das calotes geladas resultante do aquecimento global, a recirculação da água (chuvas, águas superficiais e subterrâneas), transporte atmosférico, migração de animais, vento e chuva são responsáveis pelo transporte de HPAs como demonstrado pela deteção destes compostos em áreas remotas (9-13).

Nos países do sul da Europa, vários fatores demográficos, como o declínio da população ativa nas regiões do interior e o abandono das atividades agrícolas levou à expansão da área ocupada por arbustos e florestas. Por outro lado, as mudanças climáticas com redução da precipitação e aumento da temperatura atmosférica potenciam o risco de ignição, resultando numa maior incidência de incêndios florestais. Em Portugal, a incidência de incêndios florestais tem aumentado ao longo do tempo afetando a qualidade do ar (14-15) e da água (16-17). As características físico-químicas dos HPAs favorecem a sua acumulação no solo e nos sedimentos donde podem ser posteriormente libertados para a água ou outros organismos vivos (17-19).

## **\_Objetivo**

No presente trabalho é avaliada a presença de HPAs em amostras de água de diferentes origens. Como o pireno foi detetado em várias amostras de água, usamos água contaminada com pireno para demonstrar a formação de derivados clorados durante a desinfeção da água com hipoclorito de sódio. A avaliação da toxicidade pelo teste do MTT em células foi utilizada como primeira abordagem do risco de exposição a estes compostos.

## **\_Materiais e métodos**

### **Amostras de água**

Durante 2015, foram recolhidas 20 amostras de água: 18 águas superficiais (9 de água salgada e 9 de água doce), 1 de água subterrânea e 1 de um bebedor público (tabela 1). Em todos os casos foram colhidos 500 mL de água e as amostras foram transportadas no escuro e armazenadas a 5°C até serem processadas. O período de armazenamento nunca excedeu as 24 horas.

### **Pesquisa de pireno e 1-cloro-pireno por GC-MS**

Pyr (Dr. Ehrenstorfer-Schäfers, Alemanha) e 1-Cl-Pyr sintetizado como descrito anteriormente (20) foram analisados por cromatografia gasosa- espectrometria de massa (4000 GC-MS, Varian, EUA). Os compostos foram recuperados de 15mL da amostra por micro extração em fase sólida (SPME) utilizando fibra de poldimetilsiloxano (PDMS, Supelco, EUA) durante 50 minutos a 70°C. Foi utilizada uma coluna capilar não-polar VF-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, fator 4, Varian, EUA) e hélio (1 mL/min) como gás de arrasto. A temperatura do forno do cromatografo gasoso foi programada do seguinte modo: de 80°C a 220°C (20°C min<sup>-1</sup>, 2 min) e até 300°C (5°C min<sup>-1</sup>, 4 min) sendo o tempo total de corrida igual a 30 minutos. A temperatura do injetor foi ajustada para 280°C e as amostras foram injetadas durante 7 minutos no modo dividido (10: 100). As condições de espectrometria de massa foram as seguintes: modo de ionização elétrica a 70e<sup>-V</sup>; tempo de varrimento: 0,84s / scan, corrente de emissão: 20 µA, temperatura da fonte: 240°C faixa de massa armazenada: 35-350 mZ. A análise foi realizada em duplicado. O

intervalo de linearidade para os compostos variou de 0,025 a 0,22 µg / L, tendo como limite de deteção (LoD) 0,008 µgL<sup>-1</sup> e limite de quantificação (LoQ) 0,025 µgL<sup>-1</sup>.

### **Contaminação da água com pireno por transferência ar-água em um sistema fechado**

Num sistema fechado foi introduzido um copo com 100 ml de água ultrapura e materiais conhecidos por libertarem HPAs por combustão, nomeadamente 2 cigarros (~1,5 g), 10 fósforos (~1,3 g) e aproximadamente 1 g de aparas de madeira e carvão. Os materiais foram queimados e o sistema foi mantido fechado por 48 horas. Após este tempo, alíquotas de 15 mL de água foram analisadas para a presença de Pyr e 1-ClPyr como descrito acima.

### **Formação de HPAs clorados durante a desinfeção da água por cloração**

A primeira cloração foi realizada em água ultrapura com concentrações de pireno compreendidas entre 0,1 a 10 µgL<sup>-1</sup>. Resumidamente, 5,7 µL de NaOCl a 14% (VWR, EUA) foram adicionados a 300 mL de água e após acidificação a pH 3 a mistura foi agitada durante 3h à temperatura ambiente. Após neutralização da mistura (pH 7-8) com uma solução de amônia a 24% (Merck, Alemanha), foi pesquisada a presença de Pyr e 1-ClPyr por GC-MS como descrito acima. Em seguida, a cloração das amostras de água resultantes da seção experimental anterior (mimetizando a contaminação da água de pireno por transferência de ar-água) foi submetida ao processo de cloração após adição de 15 µgL<sup>-1</sup> de PAHs ou não.

### **Cultura celular e tratamento com poluentes**

Células de hepatocarcinoma humano (HepG2- ATTC-HB-8065) foram mantidas como descrito anteriormente (20). Foi preparada uma nova solução de 1-ClPyr diluindo uma solução 20 mM em dimetilsulfóxido (DMSO; Merck, Alemanha), num volume adequado de meio de tratamento (20) antes de cada experiência.

### **Viabilidade celular e citotoxicidade de poluentes**

As células HepG2 foram cultivadas a uma densidade de 1x10<sup>4</sup> cels/poço numa placa de 96 poços e incubadas a 37°C/5% de CO<sub>2</sub>, durante 24h. Foram então expostas a 2µM de 1-ClPyr por

períodos de tempo distintos até 72h. Células não expostas aos compostos foram usadas como controle negativo. O ensaio de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) (atividade mitocondrial) foi usado para avaliar os efeitos citotóxicos do 1-CIPyr. Após exposição ao 1-CIPyr, as células foram lavadas com PBS e posteriormente incubadas com 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de MTT em meio de tratamento por 4h a 37°C/5% de  $\text{CO}_2$  em atmosfera húmida. Posteriormente, a solução de MTT foi removida e 100  $\mu\text{l}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço para dissolver os cristais de formazan, por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. A absorvância a 570 nm foi medida usando um espectrofotómetro Multiscan Ascent (Thermo Labsystems). A viabilidade celular (%) avaliada pela atividade mitocondrial (MTT) das células tratadas foi calculada como a razão entre a absorvância média das células tratadas e controlo. Os resultados foram expressos como a média ( $\pm$  DP) de pelo menos três experiências independentes por condição de tratamento realizadas em triplicado.

#### Despolarização da membrana mitocondrial

Mitotracker Red CMXRos (ThermoFischer Scientific, EUA) é uma sonda que se difunde livremente através da membrana celular e se acumula dentro de mitocôndrias ativas metabólicas (21). Esta sonda foi utilizada para avaliar qualitativamente a despolarização da membrana mitocondrial de acordo com as instruções do fornecedor. Células não tratadas e células expostas a 50 mM de cianeto de carbonil metilo m-clorofenil-hidrazona (CCCP) por 24 h foram usadas como controlo negativo e positivo, respetivamente. As células tratadas com 2  $\mu\text{M}$  1-CIPyr, foram incubadas com 50  $\mu\text{M}$  MitoTracker Red por 30 minutos antes de se atingirem as 24, 48 ou 72h de exposição ao poluente. As células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído a 4% durante 15 minutos à temperatura ambiente protegidas da luz. O núcleo das células foi corado com Hoechst (10  $\mu\text{L}$  / mL) durante 2 minutos. As lâminas foram então montadas por inversão numa gota de meio de montagem de fluorescência previamente colocado numa lâmina de vidro. As amostras analisadas por microscopia confocal (Leica, SP2) sob uma objetiva de imersão de 40x e uma ocular de 10x. Pelo menos duas experiências independentes em duplicado foram realizadas.

#### Análise estatística

Os resultados da viabilidade celular e da citotoxicidade dos poluentes foi realizada pelo teste ANOVA de uma via com teste de comparação múltipla de Tukey. Os resultados são considerados estatisticamente significativos para valores de  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como a média ( $\pm$  desvio padrão -DP) de pelo menos três experiências independentes.

#### \_Resultados e discussão

Inicialmente a presença de Pyr e 1-CIPyr foi pesquisada em 20 amostras de água de naturezas (águas superficiais salgadas ou doces, subterrânea e água da rede) e origens diversas (tabela 1). O Pyr, foi detetado em três amostras colhidas no distrito de Setúbal: água doce superficial de uma fonte decorativa (38° 22'54.6"N 8° 28 '15.9"W), águas subterrâneas (38° 22'54.6"N 8° 28 '15,9"W), água superficial salgada (38° 30'04,3"N 8° 55'24,8"W; 38° 28'54,8"N 8° 49'16,9"W); e a amostra de água da rede recolhida no distrito de Beja (38° 08'38.1"N 7° 26'58.9"W). A concentração de Pyr nestas amostras estava acima do limite de deteção (8  $\text{ng L}^{-1}$ ), mas abaixo do limite de quantificação (25  $\text{ng L}^{-1}$ ) do método. O derivado clorato (1-CIPyr) estava ausente ou abaixo do limite de deteção do método em todas as amostras (tabela 1). Este resultado está de acordo com estudos anteriores que consideram o Pyr como um dos HPAs mais abundantes em amostras de água (13,22,23).

Para avaliar o potencial risco para a saúde humana é importante ter em conta não só os poluentes, e as suas concentrações, mas também as vias de exposição. No caso da água, a ingestão é a primeira a considerar. No presente estudo, todas as amostras de água doce superficial recolhidas em barragens com pontos de captação de água para consumo humano foram negativas para HPA. Em termos de saúde pública, este é um resultado tranquilizador, uma vez que a exposição a HPA pode causar diversos problemas de saúde agudos e crónicos (8). Os resultados obtidos para as amostras de água da rede e subterrânea foram mais preocupantes. Apesar dos baixos níveis de Pyr, a capacidade deste se concentrar em compartimentos lipofílicos repre-

Tabela 1: ↓ Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras de água.

Coordenadas GPS	Distrito	Amostra	Pyr	1-ClPyr
41° 22'42.2"N 6° 21'05.2"W	Bragança	Água superficial (doce)	-	-
41° 05'10.1"N 8° 07'53.2"W	Porto		-	-
40° 20'16.7"N 8° 11'36.9"W	Coimbra		-	-
41° 39'10.3"N 8° 13'50.6"W	Braga		-	-
41° 35'24.5"N 8° 07'56.6"W	Braga		-	-
40° 02'53.6"N 7° 00'55.4"W	Castelo Branco		-	-
38° 22'54.6"N 8° 28'15.9"W	Setúbal		+	-
38° 24'15.1"N 7° 22'36.6"W	Évora		-	-
38° 11'51.0"N 7° 29'45.2"W	Beja		-	-
38° 41'59.6"N 9° 10'35.6"W	Lisboa	Água superficial (salgada)	-	-
38° 41'31.0"N 9° 25'08.7"W	Lisboa		-	-
38° 30'04.3"N 8° 55'24.8"W; 38° 28'54.8"N 8° 49'16.9"W	Setúbal*		+	-
38° 22'54.7"N 8° 28'15.0"W	Setúbal	Água subterrânea	+	-
38° 08'38.1"N 7° 26'58.9"W	Beja	Água da rede	+	-

\* 7 amostras foram recolhidas entre estes dois pontos. As concentrações de Pyr ou 1-ClPyr são inferiores (-) ou superiores (+) ao limite de deteção ( $0,008 \mu\text{gL}^{-1}$ ).

senta uma ameaça para a saúde dos seres humanos a longo prazo. Esta preocupação foi expressa pela Organização Mundial de Saúde (OMS), tendo em conta a toxicidade de cada um dos HPAs na água e a absorção total estimada em um consumo de água de 2 L por dia (24). Além disso, as águas subterrâneas nas zonas rurais são frequentemente utilizadas em atividades agrícolas e isso pode levar à acumulação de HPAs em, por exemplo, vegetais ou animais para consumo humano. Portanto, a ingestão de alimentos contaminados é outra rota de exposição a estes poluentes. Tal também deve ser considerado para a água salgada, já que os moluscos, crustáceos e peixes são capazes de acumular HPAs devido à sua elevada lipofilia (18,19,25,26). A exposição por via dérmica (27) pode ser preocupante no caso de amostras de águas superficiais recolhidas em áreas balneares, como a do presente estudo (Setúbal: 38° 30'04,3"N

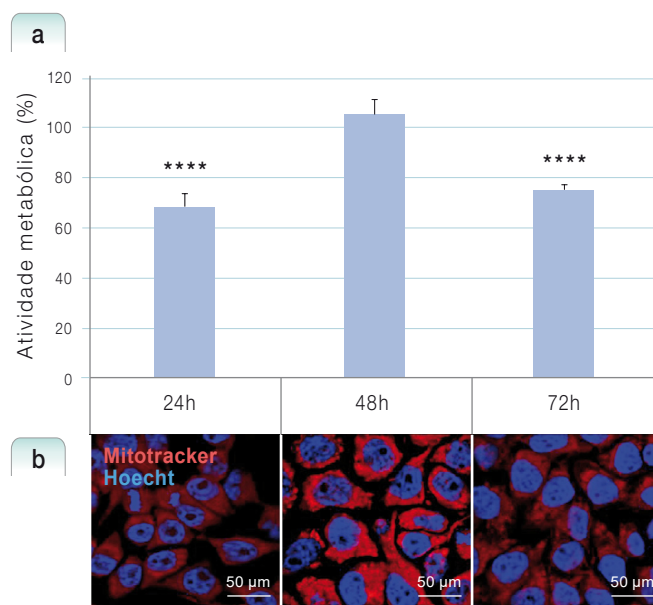
8° 55'24,8"W; "38° 28'54,8"N 8° 49'16,9"W). A baía de Setúbal, localizada no Parque Natural da Arrábida, alberga algumas das praias mais frequentadas pelos habitantes de Lisboa estando também perto de rotas marítimas para portos de pesca (Setúbal e Sesimbra) e outros portos comerciais localizados em Lisboa e Sines. Esta situação potencia o risco de contaminação da água devido ao tráfego marítimo e conseqüente exposição humana por via dérmica.

A contaminação da água por Pyr resultante da combustão de diversos materiais foi previamente demonstrada (1,2,28,29). Aqui pretendemos demonstrar que quando tal ocorre num sistema fechado pode levar à acumulação deste poluente na água, que durante o tratamento de desinfecção com hipoclorito (cloração) pode originar derivados clorados (30,31). Nas condições do nosso ensaio, a concentração de Pyr na água

foi de  $0,17 \pm 0,014 \mu\text{gL}^{-1}$  após 48h, enquanto que 1-CIPyr não foi detetado ( $<8 \text{ ngL}^{-1}$ ) mesmo após cloração da água. Estes resultados sugerem que ou é necessária uma concentração mínima de Pyr para que se forme 1-CIPyr ou que o rendimento da reação é muito baixo. Para testar a hipótese, primeiro submetemos à cloração soluções com diferentes concentrações de Pyr em água ultrapura. Nestas condições, só foi possível detetar 1-CIPyr ( $0,551 \pm 0,0014 \mu\text{gL}^{-1}$ ) quando uma concentração inicial de  $10 \mu\text{gL}^{-1}$  de Pyr estava presente. No entanto, quando em vez de água ultrapura enriquecida em Pyr, foi usada a água contaminada experimentalmente (contendo  $0,17 \pm 0,014 \mu\text{gL}^{-1}$  Pyr) foi obtido um resultado diferente. Neste caso, após a adição de Pyr para atingir uma concentração de  $15 \mu\text{gL}^{-1}$ , antes da cloração foram detetadas  $0,185 \pm 0,027 \mu\text{gL}^{-1}$  de 1-CIPyr na amostra clorada. O menor rendimento da reação em comparação com a água ultrapura sugere que a cloração de outros HPAs pode ocorrer em paralelo.

Finalmente, usamos a linha celular HepG2 derivada de fígado humano, considerada um dos melhores modelos celulares para prever a toxicidade humana (32), para avaliar a toxicidade do 1-CIPyr pelo ensaio de MTT. Este composto foi selecionado para o ensaio de toxicidade, uma vez que os HPA halogenados são considerados potencialmente mais tóxicos do que os respetivos compostos parentais (33-35). A citotoxicidade induzida pela exposição a  $2 \mu\text{M}$  1-CIPyr (concentração máxima solúvel do composto, determinada por GC-MS) após 24, 48 e 72h foi avaliada pela atividade mitocondrial através de MTT (figura 1a). Após 24 e 72h, a diminuição da atividade mitocondrial foi estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) quando comparada com o controlo (células não expostas ao poluente), mas não após 48h. Este resultado está de acordo com a flutuação da despolarização da membrana mitocondrial refletida pela diminuição de acumulação de MitoTracker Red após 24 e 72h, mas não após 48h de exposição a  $2 \mu\text{M}$  1-CIPyr (figura 1b). O efeito tóxico inicial às 24h demonstrado pelos dois ensaios pode resultar duma capacidade limitada de desintoxicação da linhagem celular via citocromo P450 (36). No entanto, a recuperação após 48h mostra que a linhagem celular poderia responder ao efeito tóxico por um tempo limitado, já que após 72h a despolarização e a viabilidade da membrana

Figura 1: Avaliação da toxicidade de 1-CIPyr em células HepG2.



A atividade metabólica das células foi avaliada pelo ensaio do MTT após exposição a  $2 \mu\text{M}$  de 1-CIPyr durante 24, 48 e 72h (a). Uma diferença significativa em relação ao controlo (células não expostas a 1-CIPyr) foi encontrada após 24 e 72h de exposição ( $p < 0,0001$ ). Nas mesmas condições, a despolarização da membrana mitocondrial foi avaliada por microscopia confocal após tratamento com *Mitotracker Red* (vermelho) que se acumula no interior da mitocôndria (a). Os núcleos foram corados com Hoescht (azul).

mitocondrial diminuem, sugerindo a necessidade de adaptação ao estímulo tóxico desencadeado pelos HPAs (37,38). Mais estudos com diferentes abordagens experimentais são necessários para desvendar os mecanismos moleculares subjacentes a este composto HPAs.

### Conclusão

Foi possível detetar Pyr em diferentes amostras de água (superficial salgada e doce, subterrânea e água da rede). Além disso, o 1-CIPyr pode ser gerado, em concentrações detetáveis, durante o processo de cloração se uma concentração mínima de Pyr estiver presente na água não tratada. Uma vez que o derivado clorado se revelou tóxico, é aconselhável monitorizar regularmente a concentração de Pyr (e outros HPAs) em água, especialmente água destinada a consumo humano.

## Agradecimentos:

Agradece-se à Fundação para a Ciência e Tecnologia (RECI/QEQMED/0330/2012) e ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) (BRJ-DSA/2012 atribuída a Sílvia José) pelo financiamento; à Alexandra MM Antunes, ao Ricardo Wanke (Instituto Superior Técnico) e à Ana S Cardoso (INSA) pela sua contribuição na síntese/caracterização de 1-CIPyr; ao grupo de A. Bettencourt (i-Med ULisboa) pelas células HepG2.

## Referências bibliográficas:

- (1) Larsen RK 3rd, Baker JE. Source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmosphere: a comparison of three methods. *Environ Sci Technol.* 2003;37(9):1873-81.
- (2) Ravindra R, Sokhi R, Van Grieken R. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation. *Atmos Environ.* 2008;42(13):2895-2921.
- (3) Billiard SM, Meyer JN, Wassenberg DM, et al. Nonadditive effects of PAHs on Early Vertebrate Development: mechanisms and implications for risk assessment. *Toxicol Sci.* 2008;105(1):5-23. Epub 2007 Dec 20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2734299/>
- (4) Ravindra K, Bencs L, Wauters E, et al. Seasonal and site-specific variation in vapour and aerosol phase PAHs over Flanders (Belgium) and their relation with anthropogenic activities. *Atmospheric Environment.* 2006;40(4):771-85.
- (5) Liu G, Tong Y, Luong JH, et al. A source study of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Shenzhen, South China. *Environ Monit Assess.* 2010;163(1-4):599-606. Epub 2009 Apr 8.
- (6) Aatmeeyata, Sharma M. Polycyclic aromatic hydrocarbons, elemental and organic carbon emissions from tire-wear. *Sci Total Environ.* 2010;408(20):4563-8.
- (7) Yue TX, Liu JL, Jørgensen SE, et al. Landscape change detection of the newly created wetland in Yellow River Delta. *Ecol Mod.* 2003;164(1): 21-31.
- (8) Tidwell LG, Blair Paulik L, Anderson KA. Air-water exchange of PAHs and OPAHs at a superfund mega-site. *Sci Total Environ.* 2017;603-604:676-86.
- (9) Abdel-Shafy HI, Mansour, MSM. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Petrol.* 2016;25(1):107-23.
- (10) Daly GL, Wania F. Organic contaminants in mountains. *Environ Sci Technol.* 2005;39(2):385-98.
- (11) Azhari A, Dalimin MN, Wee ST. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) pollution from vehicle emission in the environment of highway roadside in Johor, Malaysia. *IPCBE.* 2011;18:58-62. <http://www.ipcbee.com/vol18/12-ICBEM2011M10007.pdf>
- (12) Guzzella L, Salerno F, Freppaz M, et al. POP and PAH contamination in the southern slopes of Mt. Everest (Himalaya, Nepal): long-range atmospheric transport, glacier shrinkage, or local impact of tourism? *Sci Total Environ.* 2016;544:382-90. Epub 2015 Dec 3. <https://iris.unito.it/handle/2318/1535480>
- (13) Li J, Li F, Liu Q. PAHs behavior in surface water and groundwater of the Yellow River estuary: Evidence from isotopes and hydrochemistry. *Chemosphere.* 2017;178:143-53.
- (14) Vicente A, Alves C, Calvo AI, et al. Emission factors and detailed chemical composition of smoke particles from the 2010 wildfire season. *Atmos. Environ.* 2013;71:295-303.
- (15) Vicente A, Calvo A, Fernandes AP, et al. Hydrocarbons in particulate samples from wildfire events in central Portugal in summer 2010. *J Environ Sci (China).* 2017;53:122-31. Epub 2016 Jun 11.
- (16) Mansilha C, Carvalho A, Guimarães P, et al. Water quality concerns due to forest fires: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) contamination of groundwater from mountain areas. *J Toxicol Environ Health A.* 2014;77(14-16):806-15.
- (17) Mansilha C, Duarte CG, Melo A, et al. Impact of wildfire on water quality in Caramulo Mountain ridge (Central Portugal). *Sustain. Water Resour. Manag.* 2017: 1-13.
- (18) Ribeiro C, Ribeiro AR, Tiritan ME. Occurrence of persistent organic pollutants in sediments and biota from Portugal versus European incidence: a critical overview. *J Environ Sci Health B.* 2016;51(3):143-53. Epub 2015 Dec 15.
- (19) Loh A, Yim UH, Ha SY, et al. Contamination and Human Health Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Oysters After the Wu Yi San Oil Spill in Korea. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2017;73(1):103-17. Epub 2017 Jul 10.
- (20) Morgado PI, Jose S, Wanke R, et al. Integration of cellular and molecular endpoints to assess the toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in HepG2 cell line. *Environ Toxicol Chem.* 2017;36(12):3404-3414.
- (21) Poot M, Zhang YZ, Krämer JA, et al. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J Histochem Cytochem.* 1996;44(12):1363-72.
- (22) WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease WHO (1998). Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Addendum to Vol. 2. Health criteria and other supporting information. Geneva, Switzerland; World Health Organization. [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwg/chemicals/polyaromahydrocarbons.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/chemicals/polyaromahydrocarbons.pdf)
- (23) Zhang A, Zhao S, Wang L, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in seawater and sediments from the northern Liaodong Bay, China. *Mar Pollut Bull.* 2016;113(1-2):592-99.
- (24) WHO guidelines for indoor air quality: selected pollutants. Copenhagen: Regional Office for Europe of the World Health Organization, 2010. [http://www.euro.who.int/\\_data/assets/pdf\\_file/0009/128169/e94535.pdf](http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0009/128169/e94535.pdf)
- (25) European Union. Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of Council on environmental quality standard in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. *JO24.12.2008:L 348/85-97.* <http://data.europa.eu/eli/dir/2008/105/oj>
- (26) European Union. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *JO 24.8.2013:L 226/1-17.* <http://data.europa.eu/eli/dir/2013/39/oj>
- (27) Menzie CA, Potocki BB, Santodonato J. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ Sci Technol.* 1992;26(7):1278-84.
- (28) Zha Q, Qian NX, Moldoveanu SC. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in the particulate phase of cigarette smoke using a gas chromatographic-high-resolution mass spectrometric technique. *J Chromatogr Sci.* 2002;40(7):403-8.
- (29) Vu AT, Taylor KM, Holman MR, et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Mainstream Smoke of Popular U.S. Cigarettes. *Chem Res Toxicol.* 2015;28(8):1616-26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4540633/>
- (30) Farré MJ, Day S, Neale PA, et al. Bioanalytical and chemical assessment of the disinfection by-product formation potential: role of organic matter. *Water Res.* 2013;47(14):5409-21.
- (31) Sun JL, Zeng H, Ni HG. Halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment. *Chemosphere.* 2013;90(6):1751-9. Epub 2012 Nov 22.
- (32) O'Brien PJ. High-content analysis in toxicology: screening substances for human toxicity potential, elucidating subcellular mechanisms and in vivo use as translational safety biomarkers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2014;115(1):4-17. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12227>
- (33) Colmsjö A, Rannug A, Rannug U. Some chloro derivatives of polynuclear aromatic hydrocarbons are potent mutagens in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res.* 1984;135(1):21-9.
- (34) Kitazawa A, Amagai T, Ohura T. Temporal trends and relationships of particulate chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons and their parent compounds in urban air. *Environ Sci Technol.* 2006;40(15):4592-8.
- (35) Ding C, Ni HG, Zeng H. Parent and halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons in rice and implications for human health in China. *Environ Pollut.* 2012;168:80-6.
- (36) Fazili IS, Jiang W, Wang L, et al. Persistent induction of cytochrome P4501A1 in human hepatoma cells by 3-methylcholanthrene: evidence for sustained transcriptional activation of the CYP1A1 promoter. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;333(1):99-109. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.162222>
- (37) Sevastyanova O, Binkova B, Topinka J, et al. In vitro genotoxicity of PAH mixtures and organic extract from urban air particles part II: human cell lines. *Mutat Res.* 2007;620(1-2):123-34.
- (38) Kang Y, Cheung KC, Wong MH. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different indoor dusts and their potential cytotoxicity based on two human cell lines. *Environ Int.* 2010;36(6):542-7.